



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ RŮZNÝCH METOD IZOLACE DNA BAKTÉRIÍ
MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH
METODÁCH**

USING DIFFERENT METHODS OF DNA ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN MOLECULAR
BIOLOGICAL METHODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Chvalková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1386/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Eva Chvalkovská**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Využití různých metod izolace DNA bakterií mléčného kvašení v molekulárně biologických metodách

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, izolace DNA bakterií mléčného kvašení, RT-PCR a HRM analýza.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Eva Chvalkovská
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předkládaná práce se zabývá probiotickými bakteriemi, izolací DNA z těchto bakterií třemi různými metodami a vlivu izolace na identifikaci DNA pomocí molekulárně biologických metod.

Probiotické bakterie jsou důležitou součástí trávicího traktu člověka. Mají důležitou roli pro funkci imunitního systému, a to díky adhezi na sliznici trávicího traktu, kde vytváří nehostinné prostředí pro patogeny. Probiotické bakterie přijímáme běžně v potravě, ať už v mléčných výrobních nebo pomocí doplňků stravy. Díky nadužívání antibiotik ovšem hrozí riziko předání vnitřní rezistence, kterou probiotické bakterie mají kvůli udržení přirozené homeostáze trávicího traktu, patogenním bakteriím. Je tedy důležité efektivně identifikovat rizikové probiotické bakterie, které mají schopnost rezistenci přenášet a eliminovat tak jejich přítomnost v potravinách a potravinových doplňcích.

V experimentální části byly zkoumány tři metody izolace DNA, metoda fenolové extrakce, izolace magnetickými částicemi a izolace komerčním kitem. DNA byla izolovaná ze tří doplňků stravy a to Biopron 9 premium, Linex forte a GS Laktobacily forte 21. Čistota a koncentrace izolované DNA byla zjištěna spektrofotometricky. Přítomnost jednotlivých kmenů DNA v potravinových doplňcích byla potvrzena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Jako nejlepší metoda izolace, co se týče čistoty a koncentrace izolované DNA byla na základě RT-PCR a spektrofotometrie vyhodnocena metoda izolace komerčním kitem.

ABSTRAKT

This thesis focused on the probiotic bacteria, DNA isolated from these bacteria by three different methods and the effect of isolation on DNA identification using molecular biological methods.

Probiotic bacteria are an important part of human intestinal tract. They have an important role in the function of the immune system due to adhesion to the mucosa of the intestinal flora. They create a inhospitable environment for pathogens. Probiotic bacteria are commonly taken in the food like dairy products or food supplements. However, overuse of antibiotics is at risk of passing on the intrinsic resistance that probiotic bacteria have to the pathogenic bacteria. The intrinsic resistance they have to maintain the natural homeostasis of the intestinal tract. It is important to effectively identify risky probiotic bacteria that have the ability to transmit resistance to eliminate their presence in food and dietary supplements.

Three methods of DNA isolation like phenol extraction method, magnetic particle isolation and commercial kit isolation were used in the experimental part. DNA was isolated from three dietary supplements, namely Biopron 9 premium, Linex forte and GS Lactobacily forte 21. The purity and concentration of the isolated DNA was detected spectrophotometrically. The presence of individual DNA strains in dietary supplements was confirmed by real-time polymerase chain reaction. The best method of isolation in terms of purity and concentration of isolated DNA was evaluated by RT-PCR and spectrophotometry using a commercial kit isolation method.

KLÍČOVÁ SLOVA: Probiotické bakterie, magnetické částice, fenolová extrakce, komerční kit, PCR v reálném čase

KEYWORDS: Probiotic bacteria, magnetic particles, phenol extraction, commercial kit, real-time PCR

CHVALKOVSKÁ, Eva. *Využití různých metod izolace DNA bakterií mléčného kvašení v molekulárně biologických metodách*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115253>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Václav Brázda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala doc. Mgr. Václavovi Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení, dále bych také ráda poděkovala Mgr. Janě Konečné a Ing. Denise Romanovské za cenné rady a ochotu. Velký dík patří také mojí rodině a přátelům za neustálou podporu.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Probiotické bakterie	8
2.1.1	Bakterie spadající do termínu probiotika.....	8
2.1.2	Vliv probiotických bakterií na lidský organismus	9
2.1.3	Probiotické bakterie a jejich příjem	9
2.1.4	Identifikace	10
2.1.5	Rezistence bakterií vůči antibiotikům.....	10
2.2	Metody izolace DNA	11
2.2.1	Fenol–chloroformová extrakce	11
2.2.2	Magnetické nanočástice	12
2.3	Polymerázová řetězová reakce	14
2.3.1	Princip PCR	14
2.3.2	PCR v reálném čase	15
3	Cíl práce	17
4	Experimentální část.....	18
4.1	Materiál	18
4.1.1	Použité bakteriální kmeny	18
4.1.2	Probiotické tablety	18
4.1.3	Bakteriální DNA	19
4.1.4	Chemikálie	20
4.1.5	Kultivační média.....	20
4.1.6	Roztoky	21
4.2	Pomůcky a přístroje	22
4.3	Metody	22
4.3.1	Oživování a uchovávání bakteriálních kultur	22
4.3.2	Příprava hrubých lyzátů buněk	22
4.3.3	Izolace DNA fenolovou extrakcí a přesrážením ethanolem	23
4.3.4	Izolace DNA pomocí komerčního kitu	23
4.3.5	Izolace DNA magnetickými částicemi	23
4.3.6	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA.....	24

4.3.7	Elektroforéza.....	24
4.3.8	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	25
5	Výsledky	29
5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	29
5.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	31
5.2.1	PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i>	31
5.2.2	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>	36
5.2.3	PCR specifická pro rod <i>Bifidobacterium</i>	39
5.2.4	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	42
5.2.5	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	45
5.2.6	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	48
5.2.7	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	51
5.2.8	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i>	54
6	Diskuse.....	57
6.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	57
6.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	59
6.2.1	PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i>	59
6.2.2	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>	60
6.2.3	PCR specifická pro rod <i>Bifidobacterium</i>	60
6.2.4	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	61
6.2.5	PCR specifická pro <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
6.2.6	PCR specifická pro <i>Lactobacillus acidophilus</i>	61
6.2.7	PCR specifická pro <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	62
6.2.8	PCR specifická pro <i>Lactobacillus casei</i>	62
7	Závěr.....	64
8	Seznam použitých zdrojů.....	65
9	Seznam použitých zkratk.....	70

1 ÚVOD

Probiotické bakterie, jinak také bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní bakterie, které jsou nedílnou součástí našeho trávicího traktu, v mléčných výrobcích, v masu atd. Produkují kyselinu mléčnou, která je konečným produktem fermentace sacharidů [1]. Mají důležitou roli pro funkci imunitního systému. Dokáží díky adhezi na stěnu trávicího traktu zabránit adhezi patogenních látek a produkují antimikrobiální látky, které vytvářejí nehostinné prostředí pro patogeny [2]. V poslední době se o probiotických bakteriích mluví i jako o bakteriích používaných jako součást léčby některých onemocnění jako například intolerance laktozy. Na základě těchto faktů se příjem probiotických bakterií zvýšil, a to hlavně díky probiotickým doplňkům stravy. Probiotické bakterie mají důležitou funkci v udržení homeostázy trávicího traktu, obsahují geny rezistentní na antibiotika. V posledních letech dochází díky nadužívání antibiotik k rozšiřující se rezistenci na antibiotika mezi patogenními bakteriemi. Bakterie mléčného kvašení se staly možnými přenašeči rezistentních genů na patogenní bakterie. Z tohoto důvodu je nutné rychle a přesně identifikovat rizikové kmeny a snížit tak jejich výskyt v potravě a doplňcích stravy. Jednou z metod identifikace je metoda PCR.

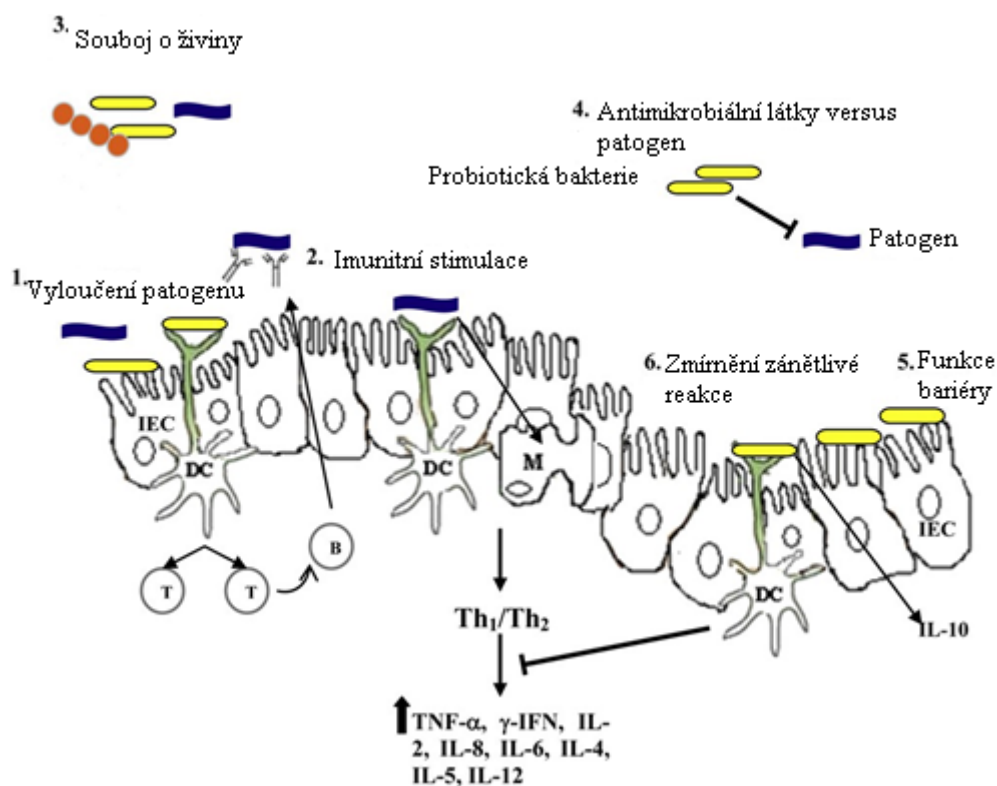
Pro identifikaci probiotických bakterií touto metodou je ovšem nutné izolovat v dostatečné čistotě a množství DNA. Je několik metod od fenolové extrakce, přes komerční kity až k separaci pomocí magnetických částic. Poslední z výše zmíněných se poslední dobou stává velmi oblíbenou metodou v laboratořích. Magnetická separace byla poprvé popsána Williamem Fullertonem v roce 1792, když použil magnet k oddělení železných minerálů [3]. Magnetické separační techniky se používají v několika různých oblastech, od výroby oceli po biotechnologii. V procesu použití magnetických částic se používá jako hlavní hnací síla pro izolaci a analýzu různých typů molekul magnetické pole [4]. Ve srovnání s konvenčními metodami je práce s magnetickými částicemi rychlá, jednoduchá, citlivá, bezpečná a DNA se získává ve vysokých koncentracích a čistotě [5].

Pro detekci izolované DNA se v dnešní době čím dál tím víc využívá již zmíněná metoda PCR. Metoda, kde díky cyklicky se opakující syntéze určitého úseku DNA značeného primery můžeme identifikovat například izolovanou DNA bakterií mléčného kvašení. Pro tuto práci byla použita RT-PCR, tedy metoda, kde můžeme díky sondě s připojeným fluorochorem sledovat průběh amplifikace a množství amplifikačních produktů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotické bakterie

WHO definuje probiotické bakterie jako živé mikroorganismy podávané v množstvích, které pozitivně ovlivňují zdraví hostitele [6]. Probiotické bakterie jsou nedílnou součástí naší střevní mikroflóry, kde mají společně se střevním epitelem, vrstvou ochranného hlenu a imunitním systémem střevní sliznice funkci střevní bariéry. Funkce spočívá v adhezi na střevní sliznici, která následně brání adhezi patogenních mikroorganismů. A právě schopnost adheze je jedním z důležitých znaků probiotických bakterií, která následně umožňuje kolonizaci střeva [6; 7]. Jednou z dalších vlastností probiotických bakterií je vliv na imunitní systém střeva. Tímto vlivem se zabývalo mnoho studií, ve kterých bylo potvrzeno, že probiotické bakterie ovlivňují několik aspektů jak získané, tak vrozené imunity. Jedná se například o vyvolání fagocytózy a sekreci IgA protilátek, které modifikují odpověď T-buněk [1]. Regulace funkce fagocytujících buněk a následné imunitní odpovědi je způsobena zvýšením hladiny SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem), které způsobují právě bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* [8; 9]. Ukázka funkce probiotických bakterií na střevní mikroflóru je uvedena na Obrázku 1.



Obrázek 1: Vliv probiotických bakterií na střevní mikroflóru člověka. Upraveno dle [10].

2.1.1 Bakterie spadající do termínu probiotika

Mezi nejčastější rody bakterií, které jsou spojovány s tímto termínem jsou rody *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* [9]. U rodu *Lactobacillus* se většinou jedná o kmeny *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* [11]. Tyto rody spadají do kategorie bakterií mléčného kvašení, jsou grampozitivní bakterie, které jsou schopny produkovat kyselinu mléčnou, která je hlavním konečným produktem fermentace sacharidů [1]. O něco méně se s tímto termínem spojují bakterie rodu *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*. Dále se můžeme také setkat s bakteriemi sporulujícími rodu *Bacillus*. Ty sice nesplňují úplně podmínky probiotických bakterií, ale jsou schopné zvládat stresové podmínky a přežít tak v komerčních preparátech a následně přejít přes trávicí trakt člověka a zůstat tak života schopné [12]. Musíme si ale uvědomit, že probiotické účinky u bakterií jsou vždy kmenově specifické [11].

2.1.2 Vliv probiotických bakterií na lidský organismus

Jak už bylo řečeno, probiotické bakterie mají svou nezastupitelnou funkci v lidském organismu. Kromě již zmíněné adheze na střevní sliznici zvyšují produkci mucinu, produkci antimikrobiálních peptidů, produkci bakteriocinů a mikrokinů, které vytváří nehostinné prostředí pro patogeny [2]. Pozitivní účinky probiotických bakterií na lidský organismus byly prokázány jak v in vitro studiích, na zvířecích modelech, tak i v klinických studiích. Jsou známy i případy, kdy došlo ke zmírnění příznaků onemocnění jako například u průjemových onemocnění, spojených s užíváním antibiotik, u laktóзовé intolerance, atopické dermatitidy, snížení alergických projevů nebo u Crohnovy nemoci [7; 1; 13].

2.1.2.1 Alergie

Je dokázáno, že pokud vystavíme střevní mikroflóru kojence probiotickým bakteriím, můžeme tak zajistit lepší funkci imunitního systému a zvýšit mukózní bariéru, která má podíl na zmírnění alergických reakcí. Tyto účinky mají hlavně vliv na potravinové alergie a atopické dermatitidy. Například bakterie *L. rhamnosus* a *B. lactis* byly v nedávné studii potvrzeny jako bakterie, které snižují závažnost atopického ekzému u kojenců [1].

2.1.2.2 Intolerance laktózy

Intolerance laktózy je způsobena nedostatkem enzymu laktázy. Tento enzym se vyskytuje v tenkém střevě a má schopnost katalyzovat hydrolýzu p-galaktosidů (kam také patří laktóza) na monosacharidy (v případě laktózy na glukózu a galaktózu). Pokud je ve střevě nedostatek jednoho nebo více enzymů, které se podílejí na trávení laktózy, dojde následně k metabolickým poruchám, které jsou známy právě jako intolerance laktózy [6].

Je ale známo, že probiotické bakterie produkují enzym laktázu, která rozštěpí laktózu na jednodušší, lépe stravitelné cukry. Na základě toho jsou schopny zmírnit příznaky intolerance laktózy. Tyto bakterie je možno přijímat v jogurtech, sýrech, nebo probiotických doplncích. Účinek je ovlivněn množstvím přijatých bakterií, schopností přechodu přes žaludek a následnou životaschopností v gastrointestinálním traktu [6]. Jako probiotické bakterie se pro intoleranci laktózy používají bakterie *S. thermophilus* a *L. delbrueckii* ssp. *Bulgarius* [1].

2.1.3 Probiotické bakterie a jejich příjem

Probiotické bakterie lze přijímat mnoha způsoby. Jedním z nich jsou mléčné výrobky, jako jsou například jogurty a kefíry, kam jsou přidávány při jejich výrobě. Je to jedna z nepřírozenějších cest příjmu probiotických bakterií. V posledních letech se probiotické bakterie objevují i v sýrech, probiotických zmrzlínách, cereáliích a kojeneckých výživách. Vzhledem k rozvíjejícím se potravinovým alergiím na laktózu, mléčný protein nebo vyšší obsah cholesterolu se na trhu čím dál tím víc objevují alternativní cesty příjmu probiotických bakterií [6].

Většinou se jedná o doplňky stravy. Zde se bakterie vyskytují v lyofilizovaných kulturách, které se sestávají z jednoho nebo více druhů probiotických bakterií. Jsou buď samy nebo s dalšími látkami vyráběny ve formě kapslí, tobolek, dražé a tablet. Nejčastější zastoupení mikroorganismů jsou *L. acidophilus* (73%), *Bifidobacterium bifidum* (40%), *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. plantarum*, *L. lactis* [7].

Pro uchovávání komerčních probiotických přípravků je nezbytné, aby bakterie byly stabilní po celou dobu skladování. Pro uchování jejich životaschopnosti záleží na typu matrice, na které jsou skladovány. Závisí na ní stabilita přípravku a interakce mezi obsaženými mikroby. Důležitou roli při dlouhodobém skladování hraje také vlhkost a stav buněk [2].

2.1.3.1 Probiotické bakterie jako doplňky stravy

Pro uchování životaschopných buněk byly vyvinuty mikroenkapsulační technologie. Aplikují se pomocí různých matic, aby ochránily bakterie před vnějším prostředím. Jedná se o povlečení malých částíček, nebo kapiček do ochranného povlaku za účelem výroby kapslí. Tyto útvary jsou velké v jednotkách od mikrometrů do milimetrů známé jako mikrokapsle. Mikroenkapsulační technologie umožňuje bakteriím oddělit se od svého prostředí ochranným povlakem a ten následně zvyšuje jejich životaschopnost [6].

Abyste měli kapsle požadované probiotické účinky, musí splňovat následující body:

- Musí odolat kyselému prostředí žaludku, žlučovým kyselinám a pankreatickým šťávám, s tím je také spojená schopnost hydrolyzovat žlučové soli.
- Musí mít schopnost adheze a kolonizace na slizniční a epitelální povrchy. Schopnost úspěšné imunitní modulační, schopnost konkurenčního vyloučení patogenů a s tím související prevence adheze patogenů.
- Antimikrobiální působení proti patogenním bakteriím.
- Musí být bezpečné [1; 7; 10].

Důležitá je i denní dávka, která by měla být podávána, aby byl zajištěný účinek. Minimální koncentrace byla v klinických studiích stanovena jako 10⁶ CFU/ml nebo gram. Také je důležité, aby si mikroorganismy zajistily životaschopnost po celou dobu skladování [1]. Avšak i přes to, že výrobci uvádějí dobu trvanlivosti u těchto potravinových doplňků kolem 24 měsíců, životnost bakterií během této doby značně klesá natolik, že nemůžeme požadované účinky předpokládat [7]. Některé studie prokázaly, že životaschopnost není nutná pro všechny probiotické účinky, protože ne všechny mechanismy účinku souvisí s životaschopností bakterií. Důležitou roli hrají i komponenty buněčné stěny některých probiotických bakterií nebo probiotická DNA [1].

2.1.4 Identifikace

Pro použití mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy je také důležité rychle a efektivně jednotlivé kmeny rozlišit. Jeden z důvodů je, aby byla prokázána vhodnost pro humánní použití. Jedná se o kombinaci fenotypových testů, následuje pak genetická identifikace pomocí molekulárních technik [1]. Identifikaci DNA probiotických bakterií se také zabývá experimentální část této práce.

2.1.5 Rezistence bakterií vůči antibiotikům

Užíváním antibiotik jsme schopni léčit většinu bakteriálních infekcí. Bohužel jsou bakterie velmi adaptabilní mikroorganismy, které jsou schopny si vybudovat vůči antibiotikům rezistenci [14]. Díky selektivnímu tlaku, kdy bylo spotřebováno až milion tun antibiotik za posledních 75 let od zavedení antibiotické léčby, jsou téměř všechny bakterie, způsobující onemocnění, rezistentní vůči antibiotikům, používaným k běžné léčbě [15]. Lidská střevní mikroflóra hraje důležitou roli ve zdraví hostitele prostřednictvím svého vlivu na imunologii, výživu a patogenezi. Ta může být ale vystavena působení různých antimikrobiálních látek, jako jsou například antibiotika. Aby střevní mikroflóra přežila vystavení těmto látkám a zachovala tak homeostázu trávicího traktu vyskytují se v bakteriích, jako jsou například bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, geny pro rezistenci vůči antibiotikům [16].

Rezistence jako taková může existovat ve dvou typech, a to vnitřní a získaná. Vnitřní rezistence vůči danému antibiotiku může být vlastní bakteriálním druhům nebo rodům, což má za následek schopnost těchto druhů přežít v přítomnosti antimikrobiálních látek v důsledku inherentní charakteristiky organismu. Tato rezistence není přenosná a nepředstavuje tak žádné riziko přenosu na patogenní bakterie. Získaná rezistence je přítomna v některých kmenech v rámci druhu, který je citlivý na dané antibiotikum. Ta může nastat mutací v bakteriálním genomu nebo přenosem genů mezi bakteriemi. Přenos může nastat buď vertikálně, a to pomocí klonálního rozptylu anebo horizontálně, což je přenos pomocí extracelulárního média. Extracelulární přenos může být pomocí konjugace (mechanismus přenosu závislý na kontaktu) a transdukce (přes zprostředkovaný bakteriofág) [17]. Nejčastější přenos genů je mechanismus konjugace, a to pomocí transpozonů a plazmidů. Právě v těchto mobilních prvcích bylo nalezeno mnoho genů rezistence na antibiotika [14; 17; 18].

2.1.5.1 Rezistence probiotických bakterií

Vzhledem k detekci genů rezistentních na antibiotika v bakteriích mléčného kvašení a schopnosti přenosu genů mezi jednotlivými kmeny se staly tyto bakterie hrozbou pro potenciální léčbu antibiotiky proti bakteriálním infekcím. Jedná se hlavně o bakterie přijímané v potravě, které se například díky nadměrnému užívání antibiotik v chovu zvířat stávají rezistentní. Už dříve byl popsán přenos genů rezistence mezi jednotlivými druhy bakterií mléčného kvašení [14]. Tento přenos by mohl probíhat in vivo mezi bakteriemi GIT a patogenními bakteriemi, protože identické geny rezistence byly nalezeny

v různých bakteriálních druzích od různých hostitelů. Z toho plyne, že pokud přijímáme bakterie mléčného kvašení buď ve fermentovaných výrobcích anebo v doplňcích stravy, můžeme tak přijímat bakterie obsahující geny rezistentní na antibiotika. To může mít negativní důsledky pro GIT, pokud by následně docházelo k přenosu mezi přijímanými bakteriemi a patogeny. Ovšem existuje jen málo informací ohledně tohoto přenosu [17].

2.1.5.2 Bakterie rodu *Lactobacillus*

Tento rod je největší skupinou bakterií mléčného kvašení a pravděpodobně nejrozšířenější probiotický rod, který se vyskytuje v řadě mléčných fermentovaných produktech, masných produktech a také v doplňcích stravy. Jeho rezistence na antibiotika je nejvíce pozorována u vankomycinu, jedná se o nejlépe charakterizovanou vnitřní rezistenci. Tato vlastnost je také užitečná pro oddělení tohoto druhu od jiných grampozitivních bakterií. Další rezistence byly potvrzeny například u gentamycinu, neomycinu, erythromycinu a streptomycinu [14; 17; 18]. Naopak nízká rezistence bakterií byla pozorována u ampicilinu, penicilinu, chloramfenikolu a tetracyklinu [14].

Vzhledem k taxonomické složitosti tohoto rodu a nedostatek shody na hraničních bodech citlivosti na antibiotika je velmi důležitá identifikace na úrovni druhů. Použití molekulárních metod, jako je například analýza mikročipem a různé techniky PCR jsou velmi užitečné při zjišťování fenotypové rezistence [17; 18].

2.1.5.3 Bakterie rodu *Bifidobacterium*

Vzhledem k tomu, že se i tento druh často vyskytuje v řadě mléčných fermentovaných produktů, masných výrobcích a doplňcích stravy byl i on zkoumán ohledně rezistence na antibiotika. I zde byla prokázána rezistence, a to u ampicilinu, penicilinu G, cefalosporinu, bacitracinu, chloramfenikolu, erythromycinu, clindamycinu, nitrofurantoinu a tetracyklinu [17].

2.1.5.4 Bezpečnost bakterií mléčného kvašení z pohledu rezistence

Vzhledem k potenciální hrozbě přenosu genů rezistence na antibiotika na patogenní bakterie se doporučuje navrhnout systém, který by umožňoval kvalifikovanou presumpci bezpečnosti. V tomto systému by mohlo být omezeno použití bakterií mléčného kvašení podle přítomnosti přenosných markerů rezistence na antibiotika. Jedno z kritérií rezistence bakterií na antibiotikum a to MIC (minimální inhibiční koncentrace) zatím nelze použít u bakterií mléčného kvašení z důvodu nedostatku relevantních údajů. Například u rodu *Lactobacillus* neexistují obecně uznávané standartní postupy pro stanovení MIC a informace o rozsahu MIC jsou spíše omezené [17].

2.2 Metody izolace DNA

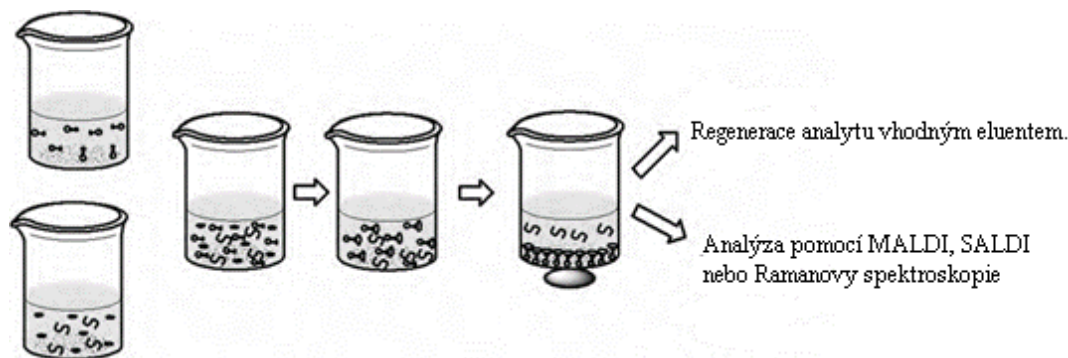
Izolace DNA je jedním z důležitých kroků v molekulárně biologických metodách. Vysoká kvalita izolované DNA je nezbytná pro amplifikaci DNA během polymerázové řetězové reakce, přípravu DNA sondy nebo adice oligonukleotidů pro přímé sekvenování. Izolace DNA z analyzovaných vzorků je jedním z více kroků identifikační procedury. Mezi tyto kroky patří buněčná lyze, inaktivace buněčných nukleáz, izolace a čištění nukleové kyseliny. Pro izolaci a čištění DNA z biologických vzorků existuje mnoho technik jako například hydrolýza s proteinázami, inkubace s detergenty nebo alkáliemi [19].

2.2.1 Fenol–chloroformová extrakce

Metoda používaná jako klasický postup izolace genomové DNA. Postup zahrnuje extrakci fenolem/chloroformem a následné srážení v ethanolu. Pro tuto metodu existují některá omezení jako například problémy spojené s četnými přenosy, kdy riziko kontaminace se zvyšuje s každým dalším přenosem. Během tohoto postupu dochází k izolaci RNA a DNA dohromady. Je to také časově náročná metoda, což může být problém pokud potřebujeme analyzovat větší množství vzorků. Pokud tato metoda izolace DNA předchází metodě PCR je potřeba izolovat DNA v dostatečném množství a čistotě. Obvykle to není problém, pokud izolujeme DNA z čistých kultur. Problém nastává, pokud ale izolujeme DNA z komplexních biologických vzorků, kdy může dojít k znečištění izolované DNA různými extracelulárními inhibitory PCR, které mohou interferovat během amplifikace [19].

2.2.2 Magnetické nanočástice

Izolace DNA z biologických vzorků pomocí magnetických částic se v posledních letech stala oblíbenou metodou. Svou oblíbenost si zajistila zejména díky své rychlosti, kompatibilitě a vysoké selektivitě. Superparamagnetické vlastnosti těchto částic umožňují snadnou izolaci produktů z roztoku pomocí vnějšího magnetického pole [20]. Díky jejich vlastnostem jsou částice preferovány pro biomedicínské aplikace, protože po odstranění magnetického pole nezachovávají žádný magnetismus [21]. Použití magnetických částic kombinuje dva procesy, a to vazbu DNA na povrch částic a specifickou izolaci magnetických objektů z komplexních vzorků (Obrázek 2). Tento způsob nám umožňuje rychlou výměnu pufrů bez použití odstředivky [19]. Významnou roli v úspěšném použití magnetických částí hrají faktory jako je magnetizace, morfologie, velikost, tvar a disperze. V závislosti na jejich povaze nebo funkci budou magnetické částice vhodné pro různé typy analytu nebo aplikace [4].



Obrázek 2: Jednotlivé kroky separace analytu pomocí magnetických částic. Upraveno dle [4].

2.2.2.1 Jádru magnetických částic

Obecně jsou magnetické částice složeny z pevného jádra, většinou se jedná o oxidy železa nebo minerálů železa jako magnetit (Fe_3O_4) nebo maghemit (Fe_2O_3) [22; 19]. Pro přípravu magnetických částic lze také použít přechodné kovy (Fe, Co, Ni), bimetalické nebo magnetické slitiny včetně Nd – Fe – B nebo Sm – Co materiálů. Čisté kovy jako Fe, Co, Ni, mají nejvyšší saturační magnetizaci ovšem jsou vysoce toxické a extrémně citlivé na oxidaci. Proto se častěji využívají již zmíněné oxidy kovů, které jsou méně citlivé na oxidaci a mohou tedy poskytovat stabilní magnetickou odezvu. Kromě toho jsou oxidy železa netoxické, chemicky stabilní, nekarcinogenní, biologicky rozložitelné, s inherentní biokompatibilitou, snadnou syntézou, snadnou funkcionalizací a nižší citlivostí na oxidační a reaktivní povrch [21].

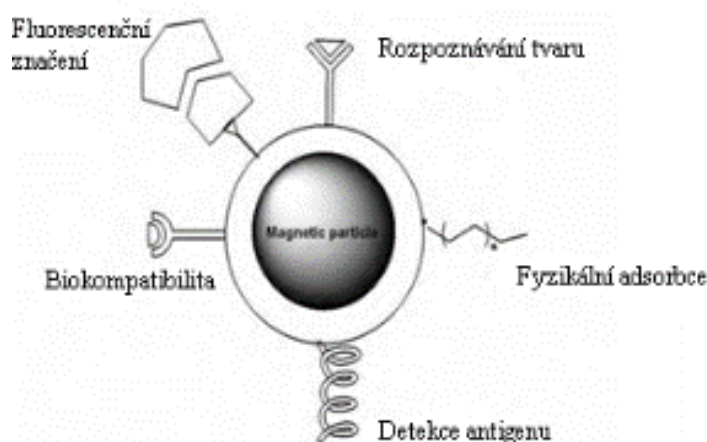
Jednou z možností syntézy magnetických částic typu magnetit nebo maghemit je koprecipitace ze solí železa v roztoku, kdy napřed vzniká maghemit a teprve potom se tvoří oxidační magnetit [20; 23]. Příprava magnetických nebo magnetizovatelných adsorbentů, používané pro předběžnou koncentraci cílových analytů z velkých objemů se také provádí syntézou z reaktivního ftalocyaninového barviva mědi imobilizovaného na jemných silanizovaných magnetitových částicích. Během přípravy dochází k potažení magnetitové fáze účinnými látkami, které tvoří vrstvu selektivní pro safarin O a extrakci krystalovou violetou [24].

2.2.2.2 Povrch magnetických částic

Pro použití magnetických částic v biologických metodách dochází k modifikacím povrchu těchto částic. Částice jsou potahovány nebo modifikovány biokompatibilními molekulami polymeru jako například kyselinou alginovou, poly(vinylalkoholem), dextranem a dalšími vhodnými nízkomolekulárními nebo vysokomolekulárními sloučeninami [19]. Díky povrchu obklopující jejich jádro jsou magnetické částice stabilní ve fyziologických roztocích, snižují toxicitu nebo minimalizují absorpci proteinu na povrch částic. Jednou z výhod je také vysoká koloidní stabilita [25]. Modifikací povrchu nanočástic můžeme modifikovat funkčními skupinami, které jsou následně zodpovědné za separační proces. Ten může být zaměřen podle biokompatibility, rozpoznávání tvaru, fluorescenční signalizace, detekce antigenu nebo

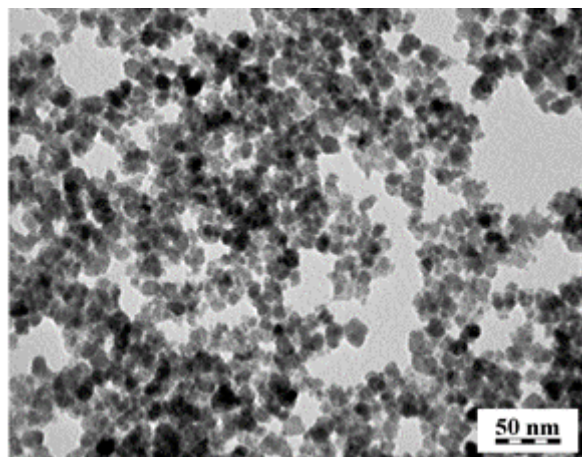
fyzikální adsorpce (Obrázek 3). Vyvinuté separační procesy by ovšem měly minimalizovat nespecifickou adsorpci, to znamená, že by měla být kontrolována interakce mezi funkční skupinou a povrchem částic [26].

Běžně se potahují povrchy hydrofobních nanočástic hydrofilními polymery. Tento proces zahrnuje výměnu ligandů, zapouzdření micel a kovalentní vazbu [21]. Je ovšem obtížné například potáhnout povrch magnetických nanočástic složených z Fe_3O_4 organickými materiály, protože na povrchu těchto nanočástic je málo hydroxylových skupin [27]. Pro potažení povrchů magnetických částic se používají polymery jako například organické polymery nebo anorganické kovové materiály. Mezi organické polymery patří například dextran nebo poly(ethylenglykol), mezi anorganické kovové materiály patří například zlato, oxidy kovů, aktivní uhlík, oxid křemičitý a oxid hlinitý [21]. Nejvíce pozornosti v poslední době získávají polymerové nátěrové hmoty. Polymerové nátěrové hmoty dělíme na syntetické a přírodní. Mezi syntetické polymerové nátěrové hmoty patří poly(ethylenvinylacetát), poly(vinylpyrrolidyn), poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina) a poly(ethylenglykol). Mezi přírodní polymerové nátěrové hmoty patří například želatina, dextran, chitosan, pullulan anebo škrob [28; 29]. Použití jednoho z výše uvedených polymerových nátěrů určuje vlastnosti vzniklých nanočástic. Jedná se například o výkonost vzniklého systému, povahu chemické struktury, délku a molekulovou hmotnost polymeru, způsob jakým je polymer k jádru magnetické nanočástice připojen, konformace polymeru nebo stupeň pokrytí povrchu částic [30; 31].



Obrázek 3: Možné procesy adsorpce analytu na magnetických částicích. Upraveno dle [4].

V předkládané práci byly použity magnetické nanočástice potažené poly(L-lysinem) (PLL). Lysin je jedna z osmi esenciálních aminokyselin. Tato aminokyselina má dobrou biologickou rozložitelnost a biokompatibilitu. Také bylo prokázáno, že je PLL vynikajícím nosičem genů [32]. Magnetické částice modifikované touto aminokyselinou jsou připravené srážením železnatých a železitých solí spolu s hydroxidem amonným. Vzniklý magnetit je oxidován roztokem chlornanu sodného na maghemit, nakonec je přidán roztok poly(L-lysinu) (Obrázek 4). Velikost vytvořených nanočástic je významně větší po 5 měsících skladování, zejména při nižších poměrech PLL/oxid železitý, v důsledku agregace částic [33].



Obrázek 4: TEM snímek polylysinových nanočástic [33]

2.2.2.3 Separace DNA pomocí magnetických nanočástic

Magnetické nanočástice se používají pro separaci, čištění a imobilizaci různých biomolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Jedná se o specifickou separaci, která je založená na komplementárních složkách jako je antigen–protilátka, virus nebo buňka. Tato technika je důležitým nástrojem pro selektivní separaci nukleových kyselin, které jsou následně použity pro další analýzu. Mezi analýzy nukleových kyselin spadá například polymerázová řetězová reakce nebo hybridizace. Technika separace nukleových kyselin pomocí magnetických částic snižuje dobu identifikace a zvyšuje citlivost a specifitu zkoumaných vzorků. Extrakce DNA touto metodou je srovnatelná s tradičními extrakčními postupy jako jsou například nemagnetické oxidy křemičité a rozpouštědla [4].

2.3 Polymerázová řetězová reakce

2.3.1 Princip PCR

PCR byla objevená Kary Mullisem v roce 1983 [34]. Dnes se jedná o jednu z nejvíce používaných molekulárních metod v laboratořích. Metoda je založená na cyklicky se opakující syntéze určitého úseku DNA. Aby byl syntetizován zkoumaný úsek DNA přidávají se do PCR směsi tzv. primery. Primery sekvencně specifické pro danou syntézu se připojují k vybraným úsekům vláken denaturované DNA. Od místa připojení primerů pak dochází k syntéze nového řetězce. Syntéza nového vlákna je započata DNA dependentní DNA-polymerázou. Během PCR dochází ke třem opakujícím se krokům:

- denaturace dvouřetězcové molekuly DNA (94 °C)
- nasednutí primerů (20–25 bází) komplementárních k nukleotidové sekvenci vybrané cílové sekvence (50–65 °C)
- syntéza nových řetězců započatá DNA-polymerázou (65–75 °C) [35; 36].

Během 25–35 opakujících se cyklů dochází s každým cyklem k exponenciálnímu navýšení vybraného úseku DNA (až 10^9 kopií). Reakce probíhá v termocycleru, kde dochází během reakce ke změnám teploty na základě výše zmíněných kroků podle předem nastaveného programu. Výsledkem této reakce jsou tzv. amplikony. Amplikony jsou úseky DNA definované délkou o velikosti desítky až tisíc párů bází (bp). Jejich přítomnost a velikost se většinou prokazuje elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Další možnost je také kvantitativní měření množství výsledného produktu metodou PCR v reálném čase [35].

2.3.1.1 Složení směsi pro PCR

Směs pro PCR se skládá obvykle z matrice DNA, podle které dochází k syntéze nového řetězce a na niž se připojují primery. Další složkou PCR směsi jsou oligonukleotidové primery. Jedná se o sekvencně specifické molekuly, které jsou připravené synteticky a jsou komplementární k určitému úseku templátové DNA. Pro syntézu nové DNA ve směru 5'→3' podle sekvence nukleotidů

v komplementárním řetězci DNA od 5' konce primeru se přidává do směsi DNA–polymeráza. Pro reakci se používá polymeráza izolovaná z mikroorganismu *Thermus aquaticus* (Taq). Jedná se o termostabilní polymerázu. Pro optimální funkci DNA–polymerázy se do směsi přidává pufr pro PCR a Mg^{2+} ionty. PCR pufr se skládá z 10 mM Tris–HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM $MgCl_2$. Hořčnaté ionty jsou nezbytné pro funkci DNA–polymerázy. Jako stavební prvky se do směsi přidávají deoxynukleosid trifosfáty v optimální koncentraci 200 μ M, vyšší koncentrace během reakce působí inhibičně [35].

2.3.2 PCR v reálném čase

2.3.2.1 Princip PCR v reálném čase

Průkopníkem této metody se stala skupina Higuchi a spol. Reakce tehdy zahrnovala interkalaci ethidium bromidu v každé amplifikační reakci. Přizpůsobený termocycler následně detekoval pomocí ozařování vzorků ultrafialovým světlem fluorescence, která byla zpracována počítačem s chlazenou CCD kamerou. Zvýšení fluorescence bylo způsobeno interkalací ethidia bromidu do zvyšujícího se množství amplifikované DNA během každého cyklu. Výsledek této reakce byl vyneseno do grafu jako přírůstek fluorescence proti počtu cyklů.

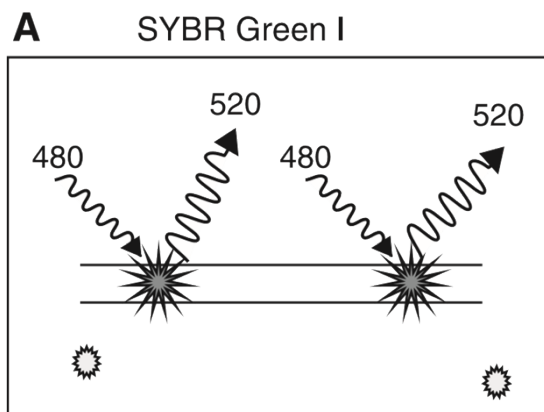
Tato technologie se uplatnila v různých oblastech výzkumu, včetně biomedicíny, mikrobiologie, veterinární vědy, zemědělství, farmakologie, biotechnologie a toxikologie [37].

2.3.2.2 Fluorescenční sonda

Oproti konvenční PCR je do směsi pro PCR v reálném čase přidána tzv. sonda. Jedná se o kus jednovláknové DNA, která je komplementární k cílové oblasti mezi dvěma primery. K sondě je chemicky připojený fluorochrom. Ten emituje fluorescenční signál během každého cyklu amplifikace [36]. Signál je měřen během amplifikace v termocycleru se zabudovaným zdrojem excitačního světla (lampa, laser nebo LED: světelná dioda), fluorescenčním detekčním systémem nebo fluorimetrem. Zaznamenaná data fluorescence zpracovává software jako křivky amplifikace [37]. Nejvyšší signál naměříme na konci každé exponenciální fáze [34]. Díky tomuto signálu jsme schopni sledovat kinetiku probíhající reakce.

Pro detekci se používají dva typy sond, a to buď dsDNA s navázaným fluorochorem, anebo ty, které detekují specifické PCR produkty prostřednictvím použití fluorochorů vázaných na oligonukleotidech. Pro detekci máme možnost využít širokou škálu komerčně dostupných fluorescenčních DNA barviv jako například ethidium bromid, YO–PRO–1, SYBR® Green nebo SYBR® GOLD. Nejvíce používané barvivo je SYBR® Green. Toto barvivo během reakce absorbuje modré světlo ($X_{\max} = 497$ nm) a emituje zelené světlo ($X_{\max} = 520$ nm) (Obrázek 5) [37].

Jednou z výhod této reakce oproti konvenční PCR je ta, že výchozí koncentrace DNA je stanovena s přesností a vysokou citlivostí [37]. Pro výpočet počáteční koncentrace DNA se používá termín C_t , tedy tzv. „prahový cyklus (threshold)“. Jedná se o cyklus, kdy intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce [36]. Čím větší je počáteční koncentrace cílové DNA ve vzorku, tím menší počet amplifikací je potřeba k detekci zvyšující se fluorescence. Platí také, že hodnoty C_t se lineárně snižují se zvyšující se koncentrací vstupní DNA [38; 34].

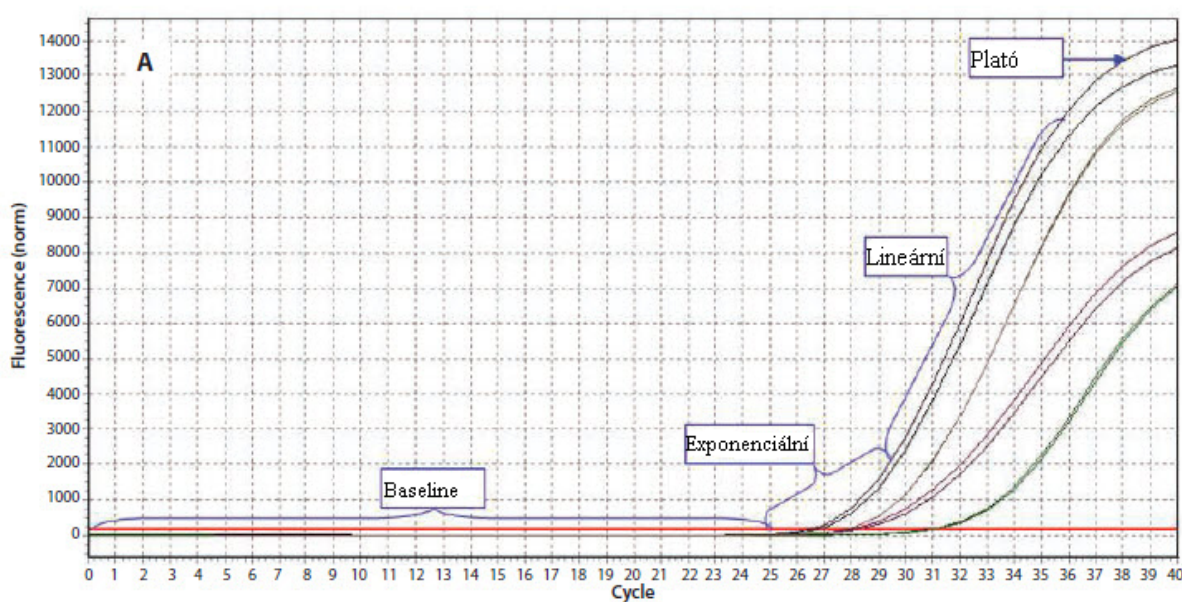


Obrázek 5: Fluorescence barviva SYBR Green [39]

2.3.2.3 Kvantifikace výsledného produktu PCR ve reálném čase

Výsledkem qPCR je amplifikační graf, což je závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů [34]. Graf se skládá ze 4 částí (Obrázek 6):

- Baseline – intenzita fluorescence je nízká vzhledem k nízké počáteční koncentraci templátu. Je detekován signál pozadí.
- Exponenciální fáze – po dosažení Ct hodnoty dochází k exponenciálnímu nárůstu amplifikované DNA a tím i nárůst fluorescence.
- Lineární fáze – se zvyšujícím se množstvím templátové DNA klesá množství DNA polymerázy a tím pádem klesá rychlost reakce.
- Plató fáze – reakce je na maximálním výtěžku, reakční sloučeniny jsou spotřebovány, systém je nasycen. [40].



Obrázek 6: Amplifikační křivka PCR v reálném čase. Upraveno dle [40].

3 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo vypracování literární rešerše na téma využití různých metod izolace v molekulárně-biologických metodách se zaměřením na probiotické bakterie.

V experimentální části byl zkoumán vliv tří metod separace DNA na čistotu a množství izolované DNA. DNA byla izolovaná ze tří výrobků probiotických tablet (Biopron 9 premium, GS Laktobacily forte 21, Linex forte). Jako metody izolace byly použity: metoda fenolové extrakce, izolace pomocí komerčního kitu a izolace DNA pomocí magnetických částic. Čistota a koncentrace DNA byla zjištěna spektrofotometricky. Přítomnost bakteriálních kmenů v probiotických tabletách byla potvrzena pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechny postupy byly dělány podle návodů uvedených ve skriptech Španová a Rittich [35].

4.1 Materiál

4.1.1 Použité bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů. (Czech Collection of Microorganisms (CCM)) sídlící na Masarykově universitě v Brně (ČR).

- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T,
- *Lactobacillus ssp. casei* CCM 7088^T,
- *Lactobacillus casei* CCM 4798,
- *Lactobacillus parasacei ssp. paracasei* CCM 1753^T,
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T,
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T

4.1.2 Probiotické tablety

Testované doplňky stravy (probiotické tablety) použité k izolaci DNA byly zakoupeny v komerční síti. Charakteristika testovaných výrobků je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika použitých výrobků

Název	Výrobce	Deklarované mikroorganismy	Deklarované CFU na 1 tobolku/tabletu výrobku	Pomocné látky	Forma
Biopron 9 Premium	Walmark a.s.	<i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	9×10^9	fruktooligosacharidy, probiotický komplex (obsahuje mléčné a sójové složky), antioxidant (kyselina L-askorbová) látko protispěková (stearan hořečnatý) tobolka (želatina, barvivo oxid titaničitý)	Tobolka
GS Laktobacily Forte 21	Green-Swan Pharmaceuticals	<i>Pediococcus acidolactici</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>B. longum</i> <i>L. casei</i> ssp. <i>paracasei</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>B. infantis</i> <i>Bi. bifidum</i>	$10,5 \times 10^9$	plnidlo (maltodextrin) fruktooligosacharidy, látko protispěková: (stearát hořečnatý) antioxidant (kyselina askorbová.) tobolka (želatina)	Tobolka
Linex® Forte	Sandoz s.r.o.	<i>L.acidophilus</i> (LA-5) <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB 12)	2×10^9	dextrosa, inulin, mikrokrystalická celuloza (E 460), bramborový škrob, oligosacharidy, stearan hořečnatý (E 470b)	Tobolka

4.1.3 Bakteriální DNA

Pro sestavení kalibrační křivky použité pro kvantifikaci bakteriální DNA v PCR v reálném čase byla použita komerční bakteriální DNA *Escherichia coli* (D4889) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.1.4 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCh VUT, Brno, ČR)
- DNA standart (100bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lactobacillus MRS broth médium (HIMEDIA, Bombaj, Indie)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeloow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)
- UltraCleanMicrobial DNA Isolation Kit (Mo Bio Labarotries Inc.)
- Další běžné chemikálie byly z komerční sítě v kvalitě p.a.

4.1.5 Kultivační média

- **MRS médium**

De Mann, Rogosa, Sharp médium (MRS médium) bylo připraveno podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Následně bylo médium vysterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 5 min.

- **MRS agar**

MRS agar byl připraven podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Následně byla půda vysterilizována při teplotě 121°C po dobu 5 min.

4.1.6 Roztoky

4.1.6.1 Roztoky pro lyzi buněk

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchačce. Pomocí NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

- **1 M Tris HCl (pH 7,8)**

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121°C.

- **Lyzační roztok A**

Bylo smícháno 10 ml 1 M Tri-HCl (pH 7,8) a 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml.

- **Lyzační roztok B**

K připravenému lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- **20% SDS**

20 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní destilované vody při teplotě 68 °C. Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

- **Proteináza K (1 mg/ml)**

10 mg proteinázy K bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody. Roztok byl rozdělen do alikvotů a uchováván při teplotě -20 °C.

4.1.6.2 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10×PCR Blue Buffer (obsahuje 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.6.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- **0,5×TBE pufr**

V 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze 27,5 g kyseliny borité. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10× zředěn na výslednou koncentraci.

- **Barvicí lázeň**

100 μl roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

- **DNA standart**

100 bp žebříček (obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 9000, 1000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

- **Nanášecí pufr Yelloow load**

(6×koncentrovaný, obsahuje barvivo orange G) (Top-Bio, Praha, ČR)

4.2 Pomůcky a přístroje

- Azure c200 (Azure Biosystems, California, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotné a kovové pomůcky apod.
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Exikátor (KIF LAB)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (OHAUS, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Finnpiette F2 různých objemů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Transiluminátor TVR 2121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (labnet International, Woodbridge, USA)

4.3 Metody

4.3.1 Oživování a uchovávání bakteriálních kultur

Tekuté MRS médium sterilizované v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut bylo napipetováno do čtyř skleněných zkumavek po 10 ml. Do tří jednotlivých zkumavek byla naočkováána příslušná kultura *Lactobacillus*, poslední zkumavka sloužila jako slepý vzorek. Kultury byly kultivovány po dobu 48 hodin při teplotě 37°C.

Po této době byly kultury po 100 µl přeočkovány do 10 ml MRS média. Přeočkované kultury byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37°C. Narostlé kultury byly skladovány v chladničce při teplotě 4°C.

4.3.2 Příprava hrubých lyzátů buněk

- Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byl napipetován 1 ml přeočkováných kultur nebo probiotických tablet. Suspenze byla centrifugována po dobu 3 minut při 14 000 ot/min.
- Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Následně byla suspenze centrifugována po dobu 3 min při 14 000 ot/min.

- Po centrifugaci byl supernatant slit a k sedimentu bylo přidáno 500 μ l roztoku B (lysozym 3 mg/ml; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0) a byl resuspendován. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- Hrubé lyzáty z potravinový doplňků stravy byly připravené z probiotických tobolek/tablet. Jedna tobolka byla opatrně rozříznuta skalpelem a její obsah byl převeden do sterilní zkumavky.
- K obsahu tablety byl přidán 1 ml roztoku B (lysozym 3 mg/ml; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0) a důkladně promíchán. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- K suspenzím (jak z čistých kultur, tak z probiotických tablet) bylo přidáno po 25 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K. Roztoky byly promíchány a inkubovány po dobu 18 hodin při teplotě 55°C.

4.3.3 Izolace DNA fenolovou extrakcí a přesrážením ethanolem

- K 500 μ l lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na hodnotu 7,8). Směs byla kývavým pohybem promíchávána 4 minuty.
- Směs byla centrifugována při 10 000 ot/min po dobu 3 minut.
- Po centrifugaci byla opatrně odebrána vodní fáze obsahující DNA.
- K odebrané vodní fázi bylo přidáno 700 μ l směsi chloroform-isoamylalkohol. Směs byla promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 minut.
- Následně byla směs centrifugována při 10 000 ot/min po dobu 3 minut.
- Poté byla odebrána vodní fáze do čisté Eppendorfovy zkumavky a bylo k ní přidání 1/10 objemu 3 M octanu sodného.
- Po promíchání byl přidán 2,5násobek objemu 96 % ethanolu a opět byla důkladně promíchána.
- Směs byla srážena při -20 °C po dobu 30 minut.
- Po srážení byla směs centrifugována při 14 000ot/min po dobu 15 minut.
- Poté byl odlit supernatant a DNA byla vysušena v exikátoru a následně byla DNA rozpuštěna v 50 μ l TE pufru o pH 7,8.

4.3.4 Izolace DNA pomocí komerčního kitu

Izolace DNA z čistých kultur a probiotických tablet byla provedena pomocí komerčního izolačního kitu QIAamp DNA StoolMini Kit (Qiagen Hilden Německo) podle postupu doporučeného výrobcem.

4.3.5 Izolace DNA magnetickými částicemi

- Do Eppendorfové zkumavky byly napipetovány komponenty podle Tabulky 2, použité magnetické nosiče jsou uvedeny v Tabulce 3.
- Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 min při laboratorní teplotě.
- Směs byla umístěna do magnetického separátoru a magnetické částice byly separovány po dobu 15 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí této doby byl odebrán supernatant.

- Z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás a do zkumavek bylo napipetováno 500 μ l 70 % ethanolu.
- Vzorek byl promíchán, byl vložen magnetický pás a po 2 minutách byl ethanol odpipetován.
- Eppendorfovy zkumavky byly vyjmuty se separátoru a vloženy do exsikátoru.
- DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě do 50 μ l TE pufru.
- Po 24 hodinách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

Tabulka 2: Složení směsi pro separaci DNA

Krok	Složka	Podíl (hm)
1	NaCl	200
2	DNA	50
3	PEG 6000 (40%)	200
4	Magnetický nosič (2 mg/ml)	50
Celkem		500

Tabulka 3: Použité magnetické částice

Částice	Fe (%hm.)	Průměr částice	Koncentrace (mg/ml)	PDI	-COOH (mM/g)	-NH ₂ (mM/g)	Polymer
F79/L3-PLL	69,8	6,20 nm	0,10	1,37	-	69,8	-

Fe (%) je hmotnostní obsah železa v magnetické částici, PDI je index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů průměrné velikosti)

4.3.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Roztok DNA v TE pufru o objemu 3 μ l byly naneseny na čočku Label GardTM mikrolitrové kyvety NanoPhotometruTM.
- Byla změřena absorbance pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny) a 320 nm oproti TE pufru.
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla vypočtena koncentrace DNA ve vzorku. Z hodnoty $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ byla určena čistota vzorku DNA

4.3.7 Elektroforéza

- Byl připraven 1,5 % agarósový gel z 1,5 g agarósy na 100 ml 0,5×TBE pufru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Směs byla nalita do vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána 30 min ztuhnout. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek.
- Na gel byly nanášeny vzorky po PCR po 15 μ l, které byly míchány se 3 μ l barviva.

- Na konec celé řady bylo napipetováno 5 µl DNA standardu.
- Gel byl dán do vany a zalit TBE pufrem
- Celá souprava byla zapojena do zdroje gelové elektroforézy, elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 3 hodin.
- Po skončení elektroforézy byl gel vložen do barvícího roztoku ethidium bromidu.
- Po odbarvení byl pozorován a dokumentován fotograficky na Azure c200 v UV světle.

4.3.8 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

- Všechny komponenty (složení qPCR 2x SYTO-9 Mater Mixu je uvedené v Tabulce 4) byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Bylo připraveno 25 µl směsi v pořadí, uvedeném v Tabulce 5. Směsi byly namíchány v boxu vyzářeném UV lampou a napipetovány do 200 µl Eppendorfových zkumavek.
- Použité primery pro kvantitativní PCR jsou uvedené v Tabulce 6, Tabulce 7, Tabulce 8, Tabulce 9, Tabulce 10, Tabulce 11, Tabulce 12, Tabulce 13.
- Byla připravena negativní kontrola, kdy místo 1 µl DNA matrice byl k 24 µl PCR směsi přidán 1 µl vody pro PCR.
- Všechny vzorky byly před PCR promíchány na centrifuze a vloženy do termocykleru s nastaveným specifickým programem, který uvádí Tabulka 14, Tabulka 15, Tabulka 16, Tabulka 17, Tabulka 18, Tabulka 19, Tabulka 20.
- Po skončení PCR byla provedena detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7

Tabulka 4: Složení qPCR 2x Syto-9 Master Mix

qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	
Komponenta	Výsledná koncentrace
Tris-HCl, pH 8,8	75 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
Tween 20	0,01 %
MgCl ₂	2,5 mM
Každý dNTP	200 µM
Taq DNA polymeráza	25 U/ml
Monoklonální protilátka anti-Taq	
DNA barvivo Syto-9	
Stabilizátory a aditiva	

Tabulka 5: Složení směsi pro kvantitativní PCR

Pořadí	Komponenta	Objem [μl] pro PCR
1.	Voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3.	Primer (10 pmol/μl)	1
4.	Primer (10 pmol/μl)	1
5.	Matrice DNA	1

Tabulka 6: Primery specifické pro doménu Bacteria [41].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Tabulka 7: Primery specifické pro rod Lactobacillus [42].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
LbLMA1rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250 bp
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	

Tabulka 8: Primery specifické pro rod Bifidobacterium [43].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914 bp
Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA	

Tabulka 9: Primery použité pro druh Lactobacillus paracasei ssp. paracasei [41].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
F_paca_IS	ACA TCA GTG TAT TGC TTG TCA GTG AAT AC	80 bp
R_paca_IS	CCT GCG GGT ACT GAG ATG TTT C	

Tabulka 10: Primery specifické pro druh Lactobacillus plantarum [44].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
F_plan_IS	TGG ATC ACC TCC TTT CTA AGG AAT	400 bp a 200 bp
R_plan_IS	TGT TCT CGG TTT CAT TAT GAA AAA ATA	

Tabulka 11: Primery specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* [45].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
Aci 16SI	TCC AAG GAA GCG AAG GAT	800 bp
Aci 16SII	CTC TTC TCG GTC GCT CTA	

Tabulka 12: Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [44].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
RhaIIvrhamnosu	CGG CTG GAT CAC CTC CTT T	400 bp a 200 bp
PrIWalter 2000	GCT TGA GGG TAA TCC CCT CAA	

Tabulka 13: Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei* [41].

Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů
F_case_IS	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	132 bp
R_case_IS	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T	

Tabulka 14: Teplotní program pro doménu *Bacteria*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	55 °C /30 s	72 °C /1 min	72 °C /5 min
	30 cyklů			

Tabulka 15: Teplotní program pro rod *Lactobacillus*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	55 °C /30 s	72 °C /60 s	72 °C /10 min
	30 cyklů			

Tabulka 16: Teplotní program pro rod *Bifidobacterium*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 60 s	50 °C /60 s	72 °C /120 s	72 °C /5 min
	30 cyklů			

Tabulka 17: Teplotní program pro druh *Lactobacillus rhamnosus a acidophilus*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	58 °C /30 s	72 °C /60 s	72 °C /5 min
	40 cyklů			

Tabulka 18: Teplotní program pro druh *Lactobacillus paracasei*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	60 °C /30 s	72 °C /60 s	72 °C /5 min
	35 cyklů			

Tabulka 19: Teplotní program pro druh *Lactobacillus plantarum*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	62 °C /30 s	72 °C /60 s	72 °C /5 min
	30 cyklů			

Tabulka 20: Teplotní program pro druh *Lactobacillus casei*.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
95 °C /5 min	95 °C 30 s	55 °C /30 s	72 °C /60 s	72 °C /5 min
	30 cyklů			

5 VÝSLEDKY

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Lyzáty byly připravené z kultur rodu *Lactobacillus* a probiotických tablet kultivované v MRS tekutém médiu. Izolace DNA byla provedena pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL) podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.5, komerčního kitu podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.4 a fenolové extrakce podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.3. Koncentrace a čistota DNA izolované pomocí výše zmíněných metod byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop, podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.6.

Naměřené koncentrace izolované DNA pomocí jednotlivých metod jsou uvedené v Tabulce 21, Tabulce 22, Tabulce 23.

Tabulka 21: Čistota a koncentrace izolované DNA pomocí magnetických částic F79/L3–PLL z čistých kultur a probiotických tablet.

Izolovaná DNA	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	c [ng/μl]
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	0,133	0,086	1,56	6,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	0,18	0,097	1,85	9,0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	0,37	0,238	1,56	18,5
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	0,168	0,097	1,74	8,4
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	0,112	0,070	1,60	5,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	0,207	0,112	1,84	10,3
Probiotické tablety Linex forte	0,049	0,036	1,36	2,5
Probiotické tablety GS Laktobacily forte	0,203	0,126	1,61	10,1
Probiotické tablety Biopron 9 premium	0,048	0,033	1,47	2,4

Tabulka 22: Čistota a koncentrace izolované DNA pomocí komerčního kitu z čistých kultur a probiotických tablet.

Izolovaná DNA	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	c [ng/μl]
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	0,533	0,281	1,90	26,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	0,958	0,494	1,94	47,9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	0,463	0,241	1,92	23,2
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	0,569	0,291	1,96	28,5
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	0,622	0,317	1,96	31,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	0,900	0,453	1,99	45
Probiotické tablety Linex forte	0,351	0,177	1,98	17,5
Probiotické tablety GS Laktobacily forte	0,846	0,429	1,97	42,3
Probiotické tablety Biopron 9 premium	0,450	0,237	1,9	22,5

Tabulka 23: Čistota a koncentrace izolované DNA metodou fenolové extrakce z čistých kultur a probiotických tablet.

Izolovaná DNA	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	c [ng/μl]
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	9,427	4,563	2,07	471,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	10,699	5,134	2,08	534,9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	15,46	7,513	2,06	773
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	13,73	6,717	2,04	686,5
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	15,778	7,482	2,11	788,9
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	5,815	2,804	2,07	290,8
Probiotické tablety Linex forte	8,086	3,949	2,05	404,3
Probiotické tablety GS Laktobacily forte	78,624	37,698	2,09	3931,2
Probiotické tablety Biopron 9 premium	5,442	2,734	1,99	272,1

V závislosti na metodě izolace DNA bylo izolováno různé množství DNA. Koncentrace nukleových kyselin se u metody izolace pomocí magnetických částic pohybovala v rozmezí 2,4–18,5 ng/μl, u

metody izolace pomocí komerčního kitu se pohybovala v rozmezí 17,5–47,9 ng/μl a u metody izolace fenolovou extrakcí 272,1–3931,2 ng/μl.

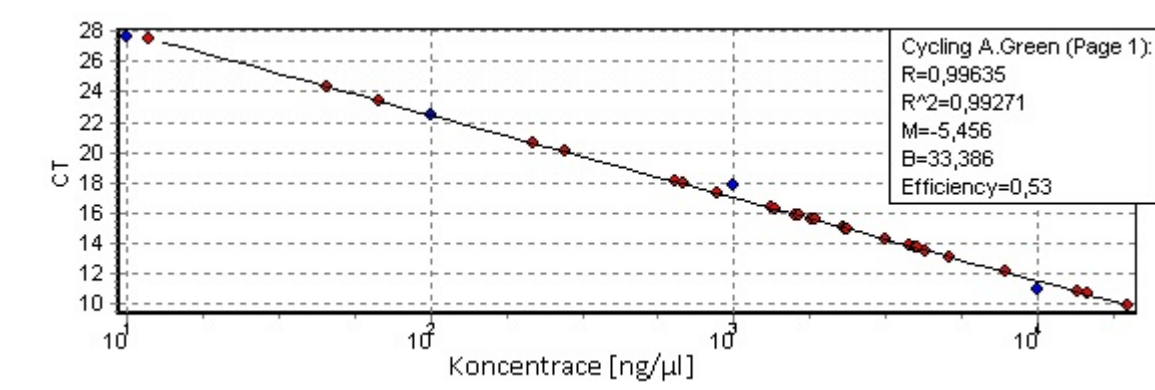
Průměrná hodnota poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} byla u metody izolace pomocí magnetických částic 1,6; u metody izolace pomocí komerčního kitu 1,9 a u metody izolace fenolovou extrakcí 2,1. Posouzení podílu A_{260}/A_{280} absorbancí naznačuje, že čistší DNA byla pozorována u metody magnetických částic.

5.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

5.2.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Pro důkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* v probiotických tabletách a čistých kulturách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [41] dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.8. Ke stanovení koncentrace bakteriální DNA ve vzorcích byla vytvořena kalibrační křivka za použití komerční bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma–Aldrich) v rozsahu koncentrací (10–0,001 ng/μl). Ze závislosti Ct na koncentraci ve srovnání s kalibrační křivkou (bod 0,001 ng/μl byl pro výpočet zanedbán) byl pomocí softwaru pro cyclor Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) stanovena koncentrace cílové DNA v rozmezí 0,011–19,879 ng/μl (koncentrace jednotlivých vzorků a hodnoty Ct jsou uvedeny v Tabulce 24). Dále byla stanovena reakční účinnost na 53 % (Efficiency), která byla vypočtena ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost reakce byla odhadnuta z korelačního koeficientu lineární regrese (R^2) s hodnotou přibližně 0,993. Vše je znázorňuje Obrázek 7.

Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 8.

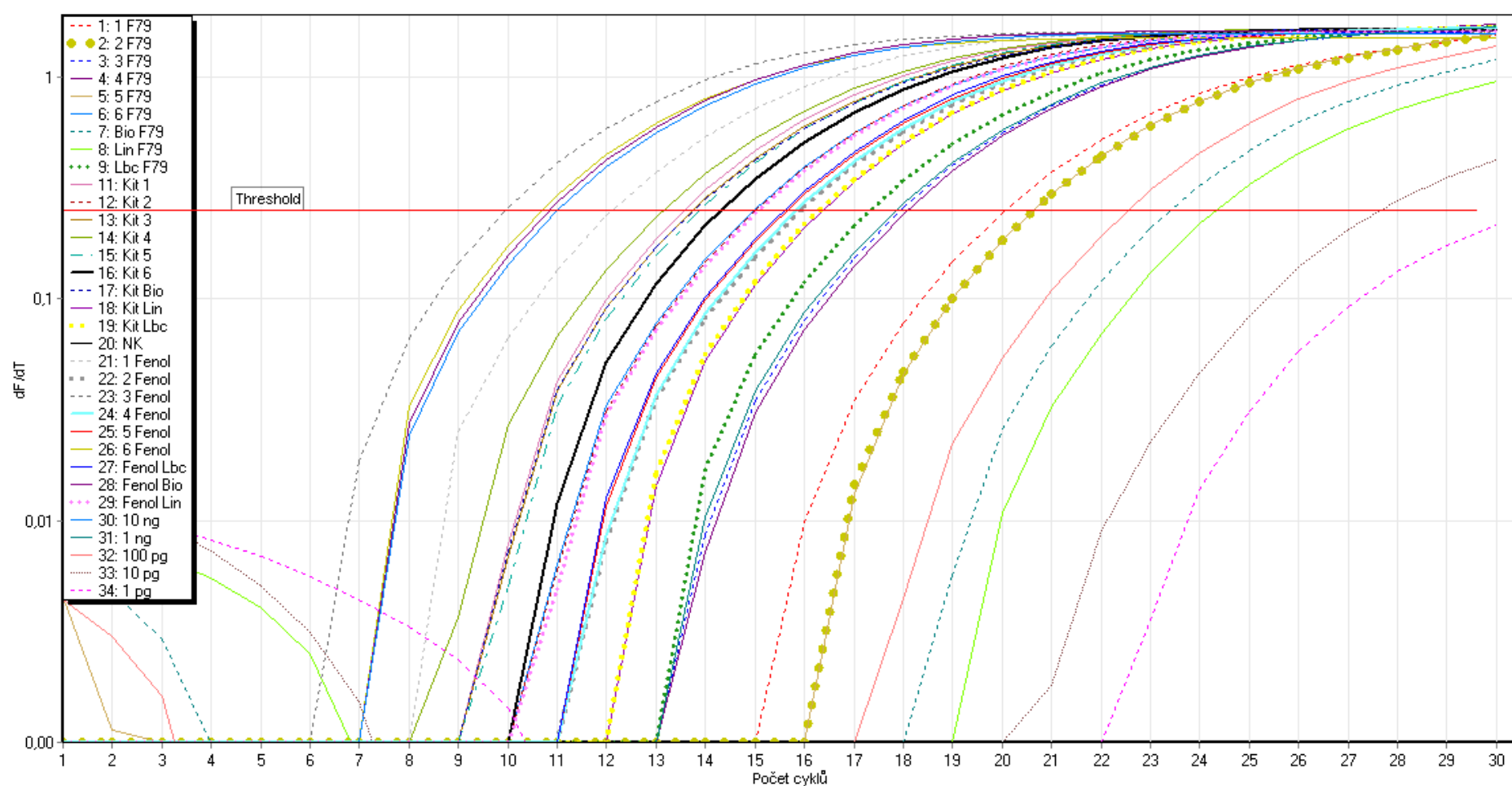


Legenda: modré body – kalibrační křivka sestavená pomocí DNA *Escherichia coli* v rozsahu (100–0,001 ng/μl), červené body – analyzované vzorky.

Obrázek 7: Kalibrační křivka – závislost Ct na koncentraci.

Tabulka 24: Výsledky kvantifikace pro doménu *Bacteria*.

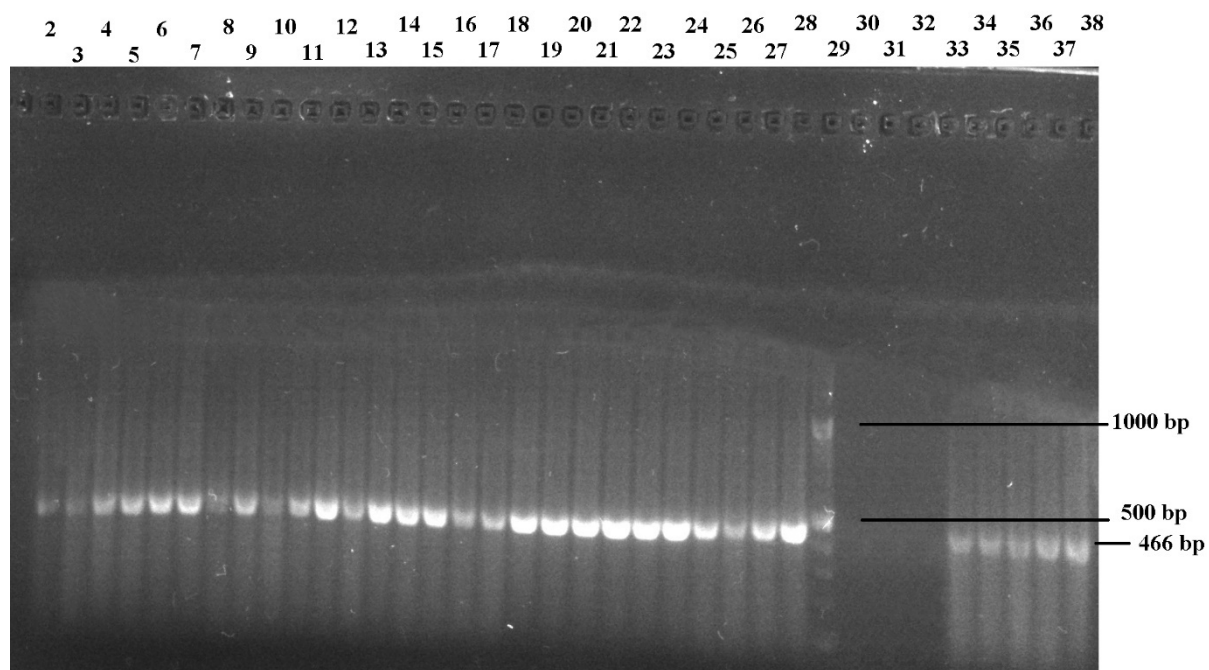
Izolovaná DNA	Metoda izolace	Ct	c [ng/μl]
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	F79/L3-PLL	20,04	0,279
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	20,62	0,219
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	17,93	0,680
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	F79/L3-PLL	18,07	0,641
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	F79/L3-PLL	20,62	0,219
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	F79/L3-PLL	14,96	2,387
Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	23,39	0,068
Linex forte	F79/L3-PLL	24,33	0,045
Laktobacily forte	F79/L3-PLL	17,31	0,884
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Komerční kit	13,55	4,317
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	15	2,345
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	13,71	4,037
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	Komerční kit	13,14	5,129
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Komerční kit	13,87	3,781
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	Komerční kit	14,3	3,146
Biopron 9 premium	Komerční kit	13,74	3,993
Linex forte	Komerční kit	16,34	1,330
Laktobacily forte	Komerční kit	16,27	1,370
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Fenolová extrakce	12,12	7,914
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	15,89	1,609
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	9,93	19,879
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	Fenolová extrakce	15,82	1,655
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Fenolová extrakce	15,62	1,806
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	Fenolová extrakce	10,67	14,600
Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	15,56	1,853
Laktobacily forte	Fenolová extrakce	10,83	13,611
Linex forte	Fenolová extrakce	15,06	2,283
10 ng		11	12,693
1 ng		17,84	0,707
0,1 ng		22,52	0,098
0,01 ng		27,62	0,011



Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3-PLL, **Kit** – extrakce pomocí kitu, **Fenol** – fenolová extrakce, **1–6** – použité pozitivní kontroly uvedené v Tabulka 27, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 8: Amplifikační křivky domény Bacteria – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 9 a v Tabulce 25. Byl amplifikován specifický produkt o délce 466 bp.



Obrázek 9: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro doménu Bacteria.

Tabulka 25: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 9.

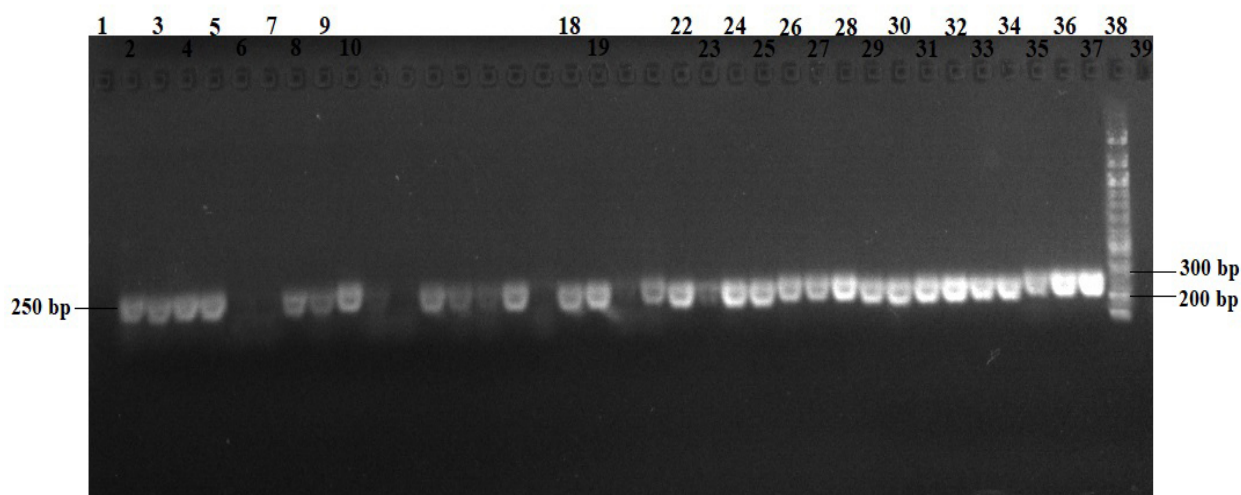
Běh	DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (466 bp)
2	<i>Lactobacillus ssp. casei</i> CCM 7088 ^T	F79/L3-PLL	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	+
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	+
5	<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	F79/L3-PLL	+
6	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> CCM 1753 ^T	F79/L3-PLL	++
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	F79/L3-PLL	++
8	Linex forte	F79/L3-PLL	+
9	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	++
10	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	+
11	<i>Lactobacillus ssp. casei</i> CCM 7088 ^T	Fenolová extrakce	++
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	+++
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	++
14	<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	Fenolová extrakce	+++
15	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> CCM 1753 ^T	Fenolová extrakce	+++
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	Fenolová extrakce	+++
17	Linex forte	Fenolová extrakce	++
18	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	++
19	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	+++
20	<i>Lactobacillus ssp. casei</i> CCM 7088 ^T	Komerční kit	+++
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	+++
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	+++
23	<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	Komerční kit	+++
24	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> CCM 1753 ^T	Komerční kit	+++
25	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	Komerční kit	++
26	GS Laktobacily forte	Komerční kit	+
27	Linex forte	Komerční kit	++
28	Biopron 9 premium	Komerční kit	+++
29	DNA standart		100 bp
32	NK		–
34	<i>Escherichia coli</i> 10 ng/ µl		+
35	<i>Escherichia coli</i> 1 ng/ µl		+
36	<i>Escherichia coli</i> 0,1 ng/ µl		+
37	<i>Escherichia coli</i> 0,01 ng/ µl		+
38	<i>Escherichia coli</i> 0,001 ng/ µl		+

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován

5.2.2 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Pro důkaz přítomnosti rodové DNA rodu *Lactobacillus* v probiotických tabletách a čistých kulturách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [42] podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontroly byly použity čisté kultury uvedené v Tabulce 27. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 11.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 10 a v Tabulce 26. Byl amplifikován specifický produkt o délce 250 bp.

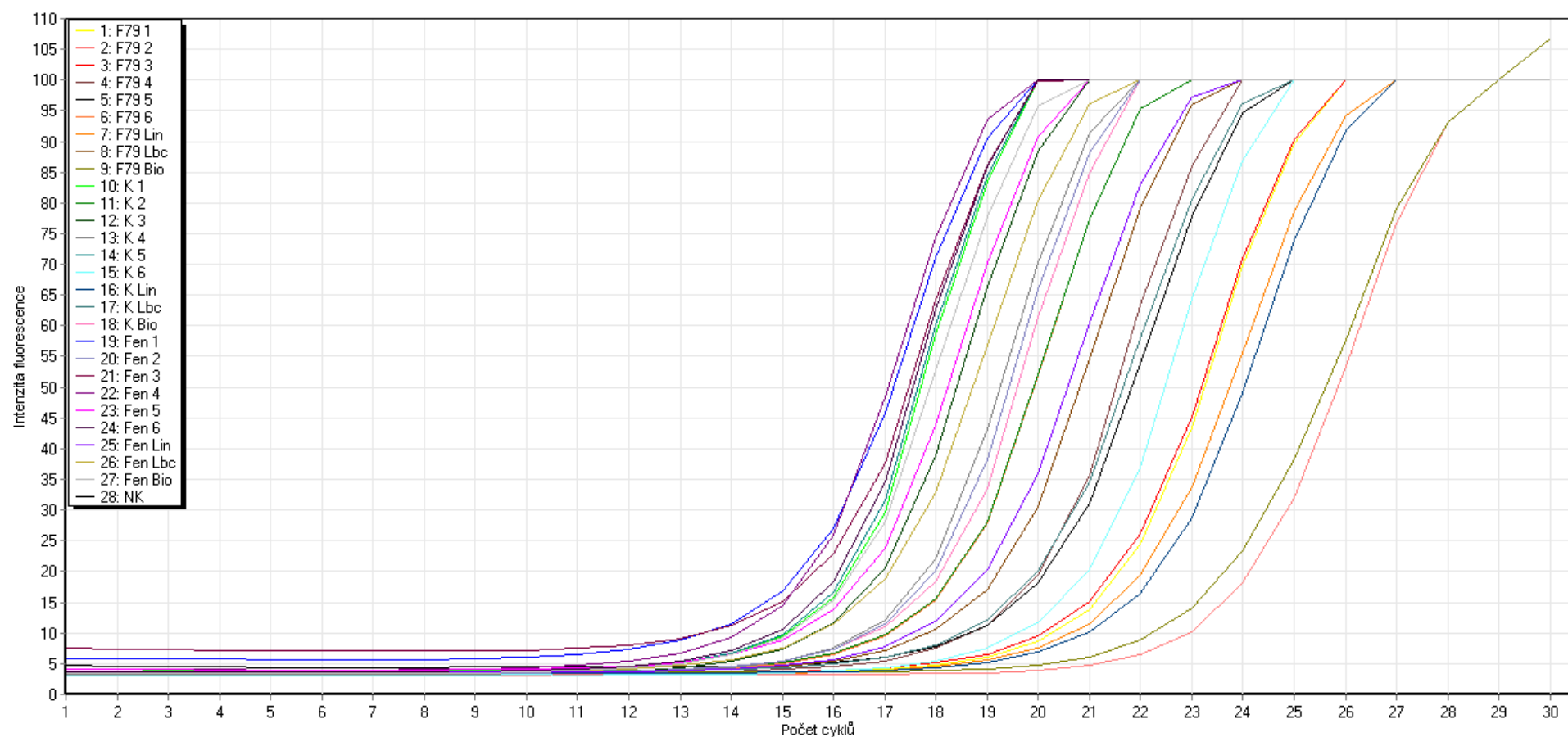


Obrázek 10: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro rod *Lactobacillus*.

Tabulka 26: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 10.

Běh	DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (250 bp)
2	<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	F79/L3-PLL	+
3	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	+
4	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	+
5	<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> CCM 4798	F79/L3-PLL	+
6	Linex forte	F79/L3-PLL	–
7	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
8	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	F79/L3-PLL	+
9	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> 4833 ^T	F79/L3-PLL	+
10	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	+
18	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	++
19	<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Komerční kit	++
22	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	++
23	<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> CCM 4798	Komerční kit	+
24	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Komerční kit	++
25	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> 4833 ^T	Komerční kit	++
26	Linex forte	Komerční kit	++
27	GS Laktobacily forte	Komerční kit	++
28	Biopron 9 premium	Komerční kit	+++
29	<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Fenolová extrakce	+++
30	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	+++
31	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	+++
32	<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> CCM 4798	Fenolová extrakce	+++
33	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Fenolová extrakce	+++
34	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> 4833 ^T	Fenolová extrakce	+++
35	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	++
36	Linex forte	Fenolová extrakce	+++
37	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	+++
38			
39	DNA standart		100 bp
40	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3-PLL, **K** – extrakce pomocí kitu, **Fen** – fenolová extrakce, **1–6** – použité pozitivní kontroly uvedené v Tabulka 27, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 11: Amplifikační křivky rodu *Lactobacillus* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

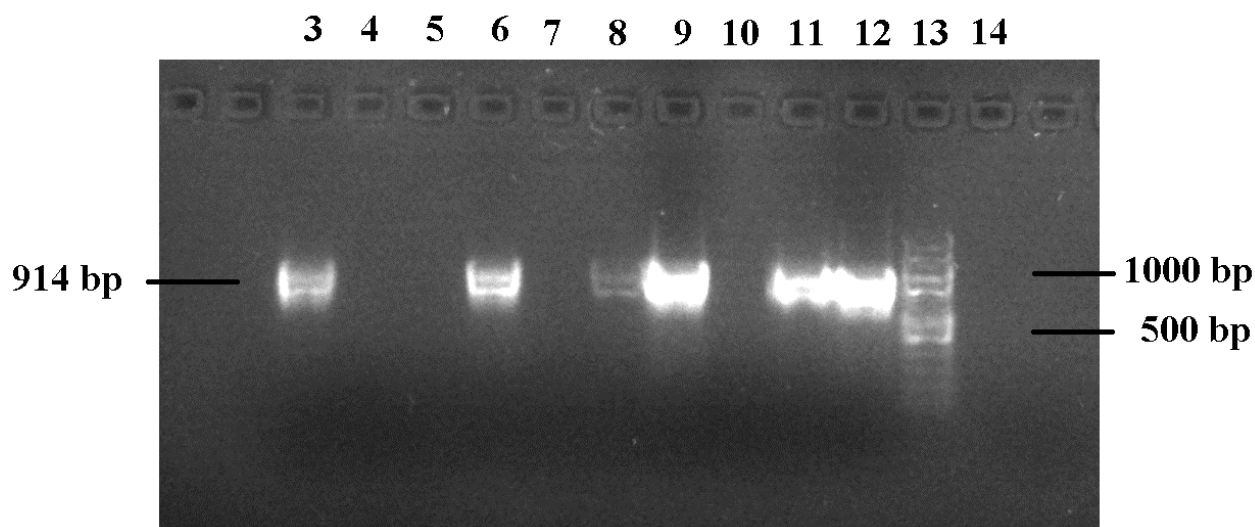
Tabulka 27: Použité pozitivní kontroly pro RT-PCR rodu *Lactobacillus*.

1	<i>Lactobacillus ssp. casei</i> CCM 7088 ^T
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T
4	<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798
5	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> CCM 1753 ^T
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T

5.2.3 PCR specifická pro rod *Bifidobacterium*

Pro důkaz přítomnosti rodové DNA rodu *Bifidobacterium* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* [43] podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987^T (10 ng/ μ l) a *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T (10 ng/ μ l). Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 13.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.7, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 12 a v Tabulce 28. Byl amplifikován specifický produkt o délce 914 bp.

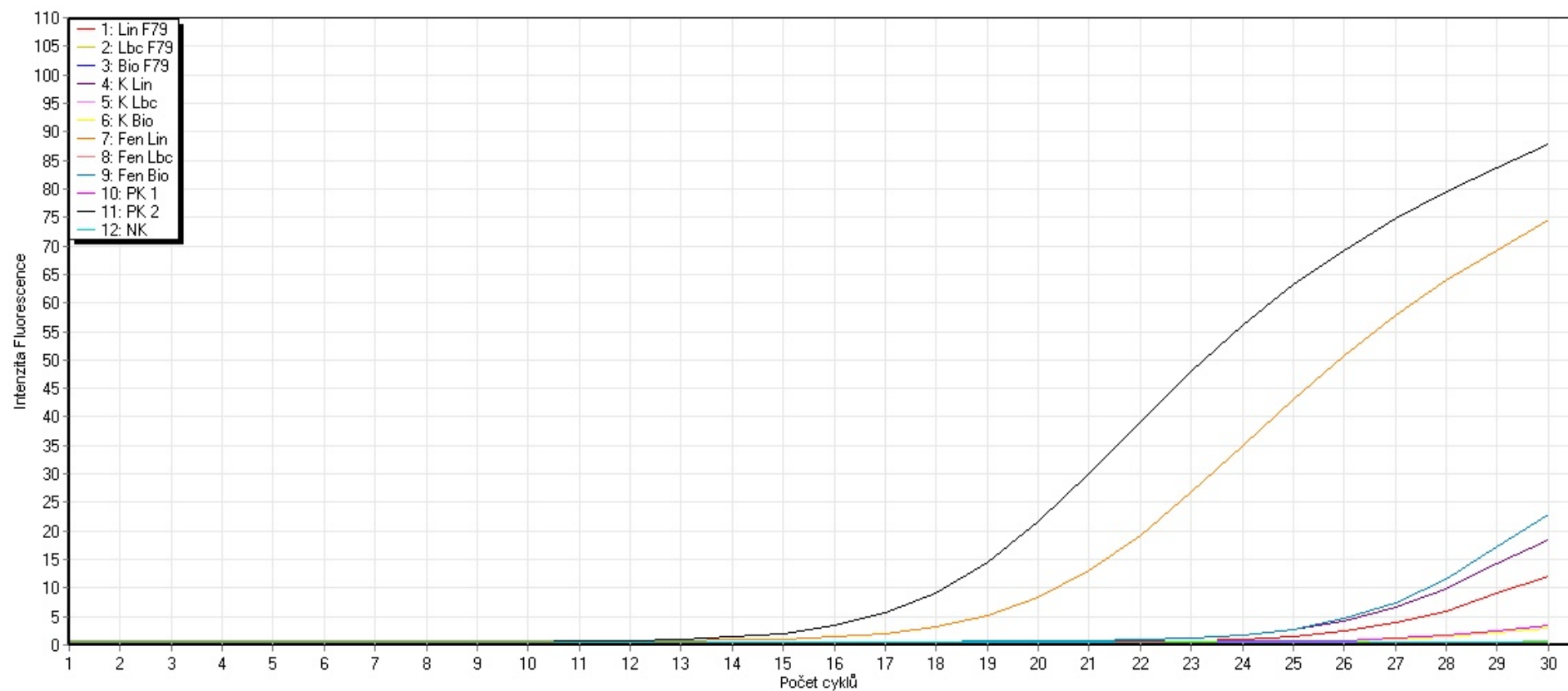


Obrázek 12: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro rod *Bifidobacterium*.

Tabulka 28: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 12.

Běh	DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (914 bp)
3	Linex forte	F79/L3-PLL	++
4	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	–
5	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
6	Linex forte	Komerční kit	++
7	GS Laktobacily forte	Komerční kit	
8	Biopron 9 premium	Komerční kit	+
9	Linex forte	Fenolová extrakce	+++
10	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	–
11	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	+++
12	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCM 4987 ^T		+++
13	DNA standart		100 bp
14	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



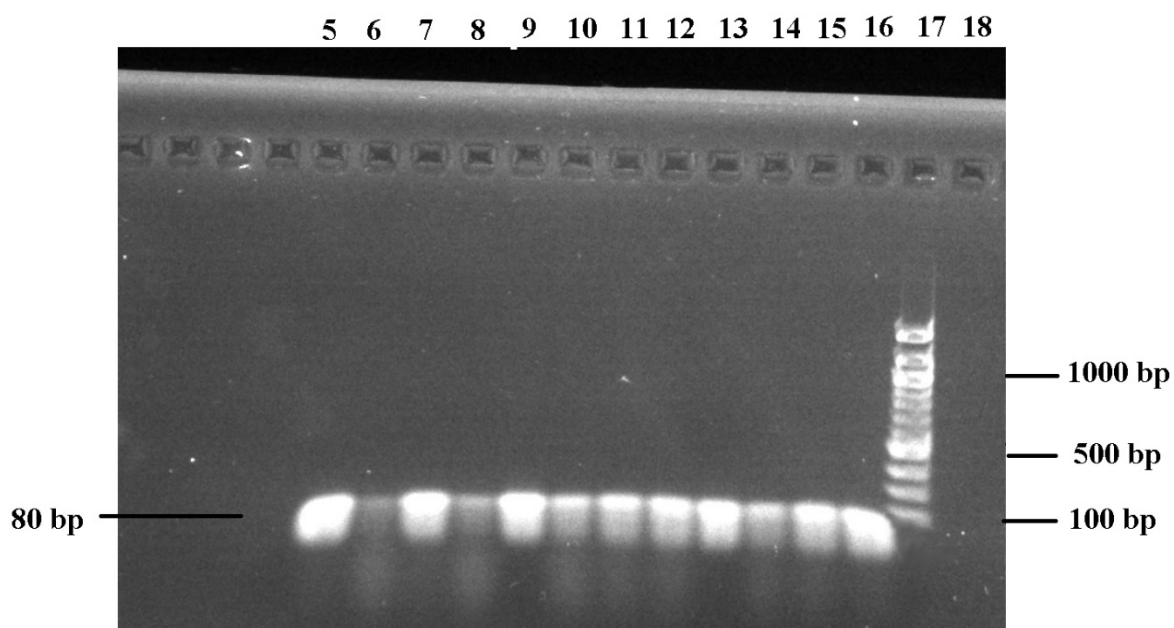
Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3-PLL, **K** – extrakce pomocí Kitu, **Fen** – fenolová extrakce, **PK 1** – *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T, **PK 2** – *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987^T, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 13: Amplifikační křivky rodu *Bifidobacterium* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

5.2.4 PCR specifická pro druh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* [41] podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 15.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, která byla provedena podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 14 a v Tabulce 29. Byl amplifikován specifický produkt o délce 80 bp.

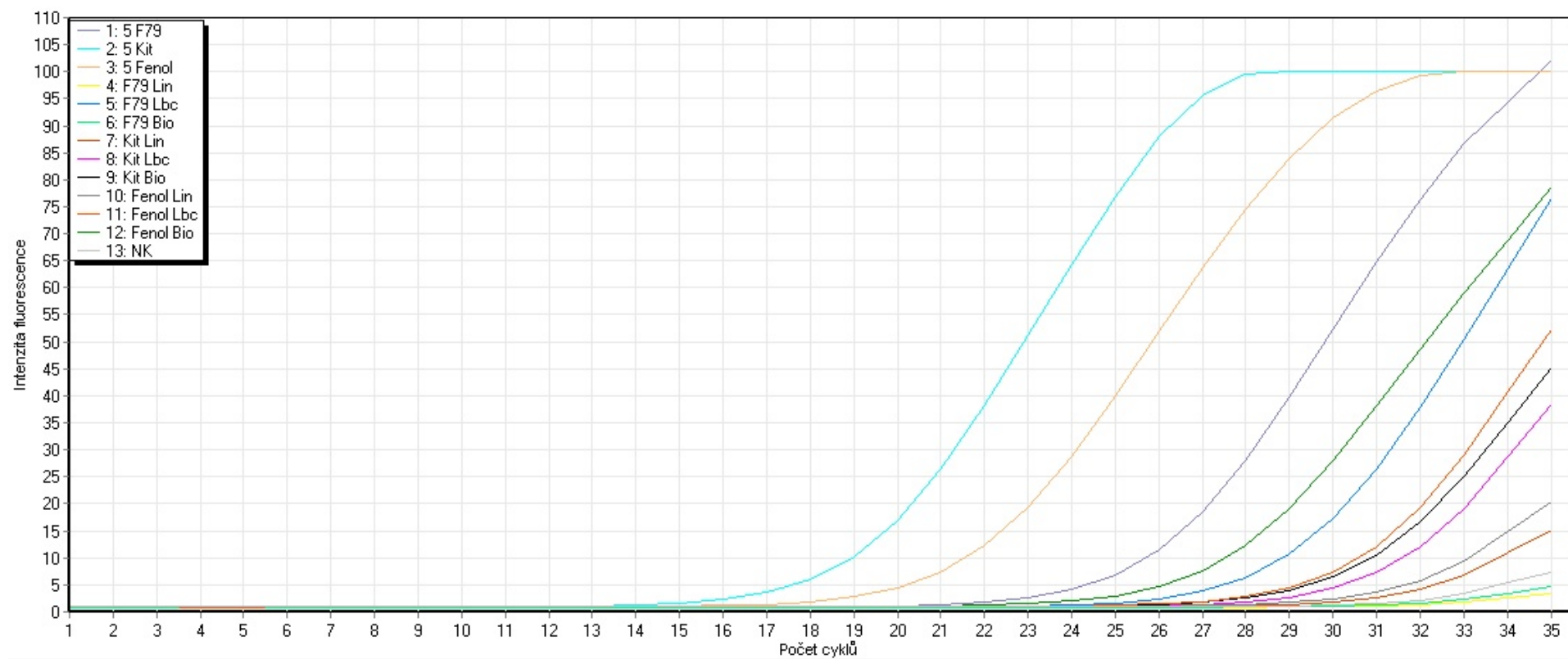


Obrázek 14: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*.

Tabulka 29: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 14.

Běh	Izolovaná DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (80 bp)
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	F79/L3	+++
6	Linex forte	F79/L3	+
7	GS Laktobacily forte	F79/L3	+++
8	Bipron 9 premium	F79/L3	+
9	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Komerční kit	+++
10	Linex forte	Komerční kit	+
11	GS Laktobacily forte	Komerční kit	++
12	Bipron 9 premium	Komerční kit	++
13	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	Fenolová extrakce	+++
14	Linex forte	Fenolová extrakce	+
15	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	+++
16	Bipron 9 premium	Fenolová extrakce	+++
17	DNA standart		100 bp
18	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



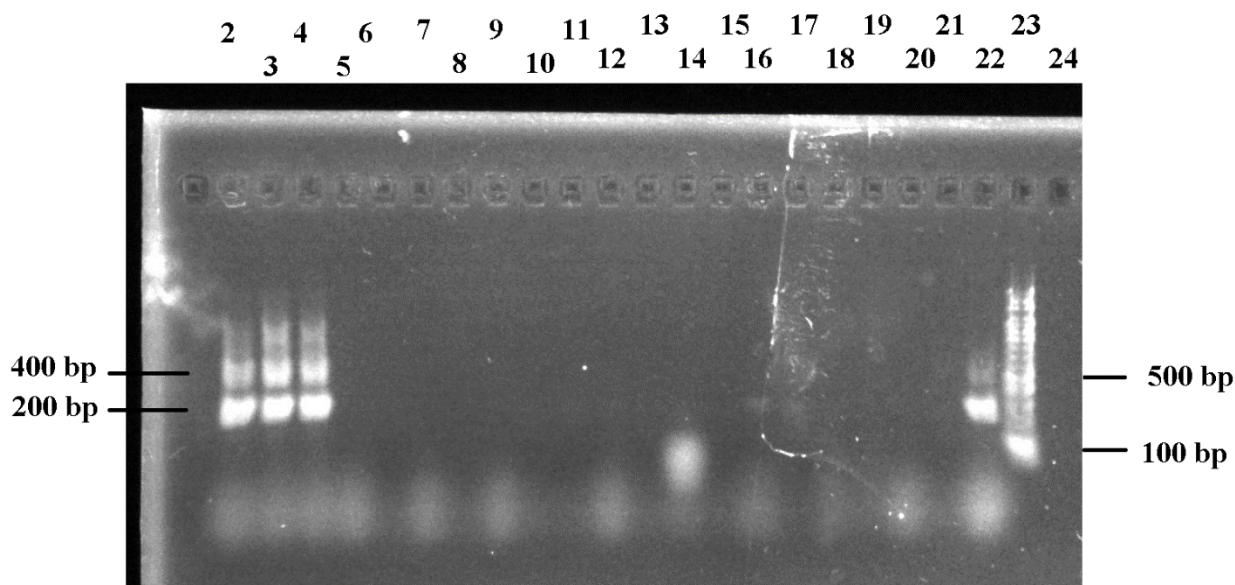
Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3, **Kit** – extrakce pomocí kitu, **Fenol** – fenolová extrakce, **5** – *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 15: Amplifikační křivky druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

5.2.5 PCR specifická pro druh *Lactobacillus plantarum*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus plantarum* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus plantarum* [44] podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 17.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, provedené podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7 jejíž výsledek je uveden na Obrázku 16 a v Tabulce 30. Byl amplifikován specifický produkt o délce 400 bp a 200 bp.

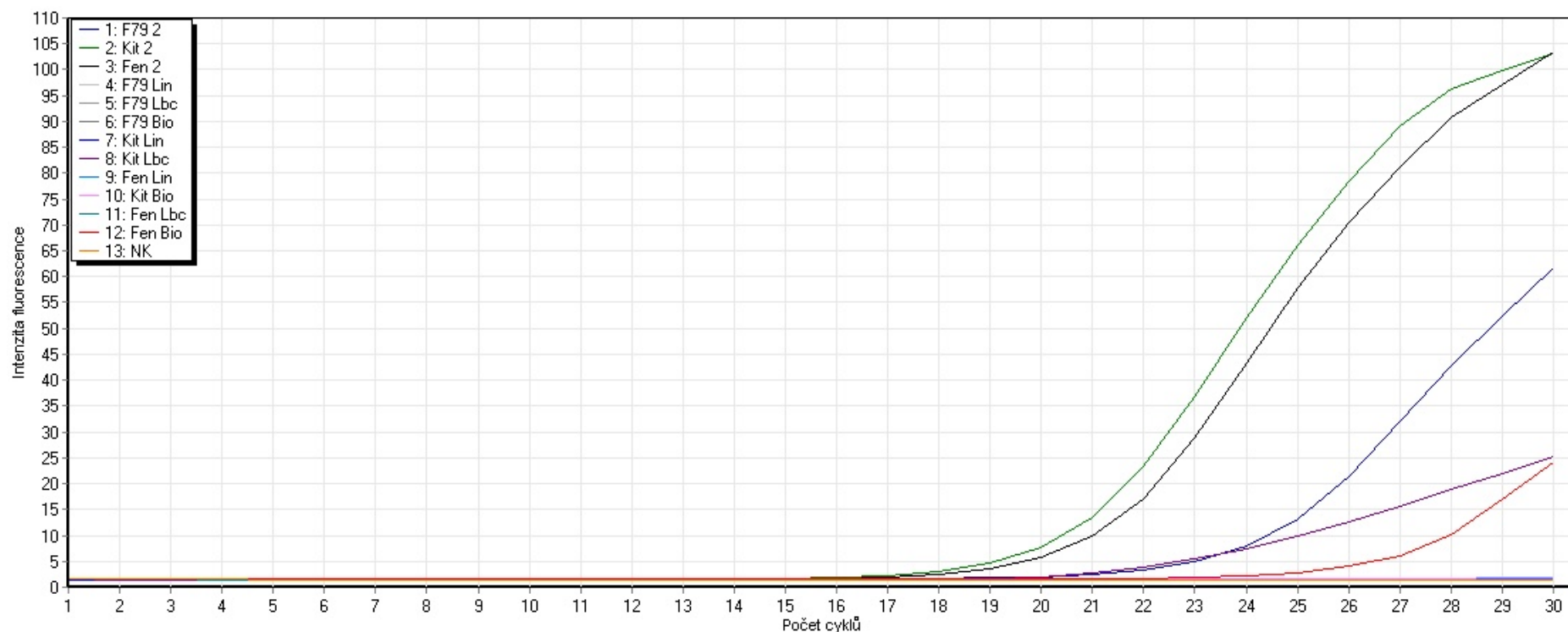


Obrázek 16: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus plantarum*.

Tabulka 30: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 16.

Běh	Izolovaná DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (400 bp a 200 bp)
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	+++
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	+++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	+++
5	Linex forte	F79/L3-PLL	–
6	Linex forte	F79/L3-PLL	–
7	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	–
8	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	–
9	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
10	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
11	Linex forte	Komerční kit	–
12	Linex forte	Komerční kit	–
13	GS Laktobacily forte	Komerční kit	–
14	GS Laktobacily forte	Komerční kit	–
15	Biopron 9 premium	Komerční kit	–
16	Biopron 9 premium	Komerční kit	–
17	Linex forte	Fenolová extrakce	–
18	Linex forte	Fenolová extrakce	–
19	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	–
20	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	–
21	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	–
22	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	++
23	DNA standart		100 bp
24	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



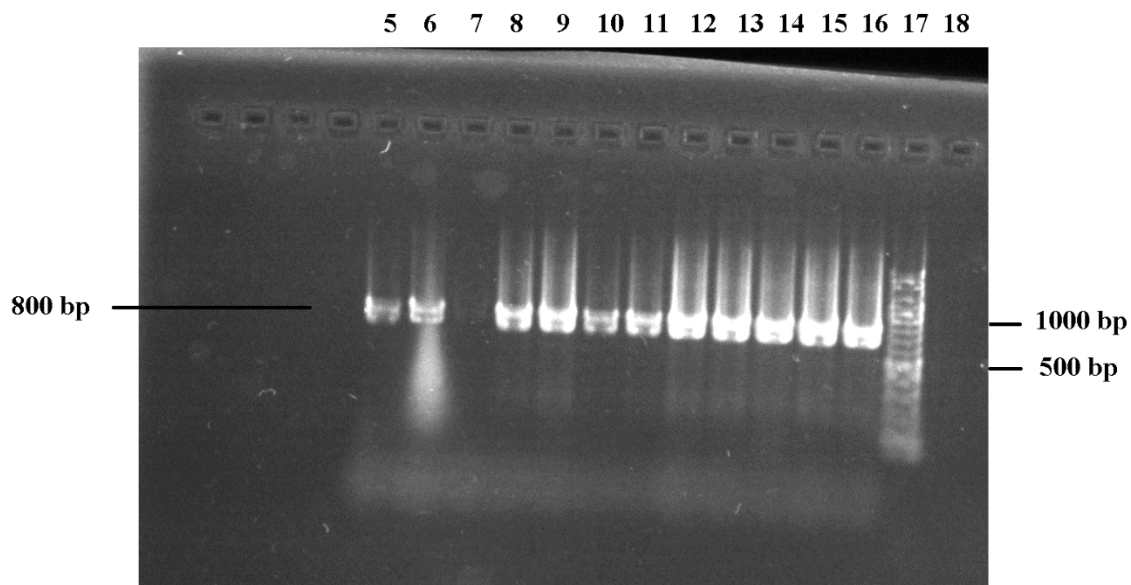
Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3, **Kit** – extrakce pomocí kitu, **Fen** – fenolová extrakce, **2** – *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK 2** – negativní kontrola

Obrázek 17: Amplifikační křivky druhu *Lactobacillus plantarum* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

5.2.6 PCR specifická pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus* [45] podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 19.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, provedené podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7 jejíž výsledek je uveden na Obrázku 18 a v Tabulce 31. Byl amplifikován specifický produkt o délce 800 bp.



Obrázek 18: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus acidophilus*.

Tabulka 31: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 18.

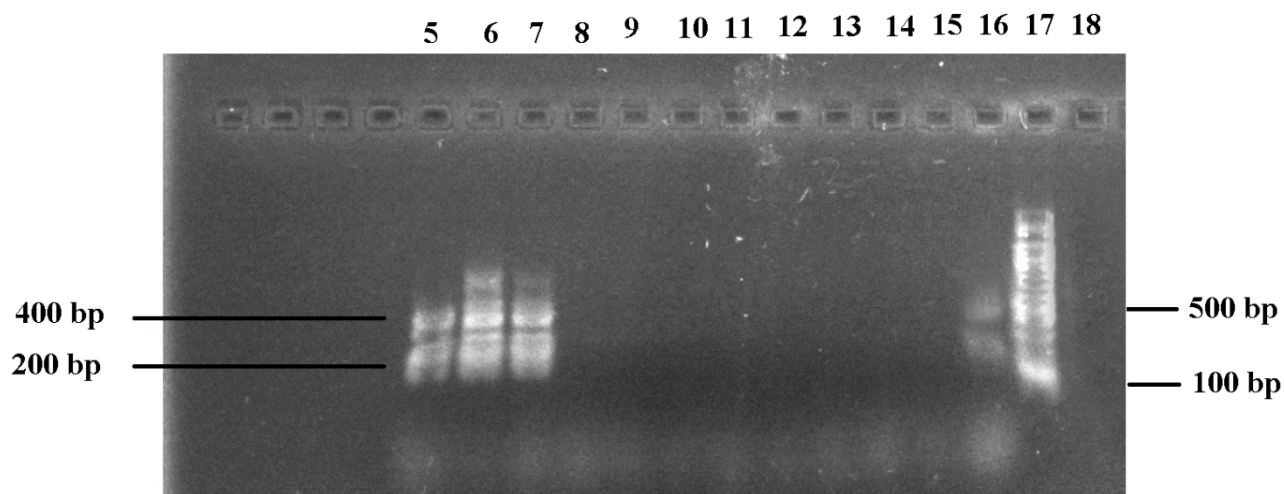
Běh	Izolovaná DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (800 bp)
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	F79/L3-PLL	+
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	Fenolová extrakce	++
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	Komerční kit	–
8	Linex forte	F79/L3-PLL	++
9	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	++
10	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	+
11	Linex forte	Komerční kit	++
12	GS Laktobacily forte	Komerční kit	+++
13	Biopron 9 premium	Komerční kit	+++
14	Linex forte	Fenolová extrakce	+++
15	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	+++
16	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	+++
17	DNA standart		100 bp
18	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován

5.2.7 PCR specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [44] podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 21.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.7, jejíž výsledek je uveden na Obrázku 20 a v Tabulce 32. Byl amplifikován specifický produkt o délce 200 bp a 400 bp.

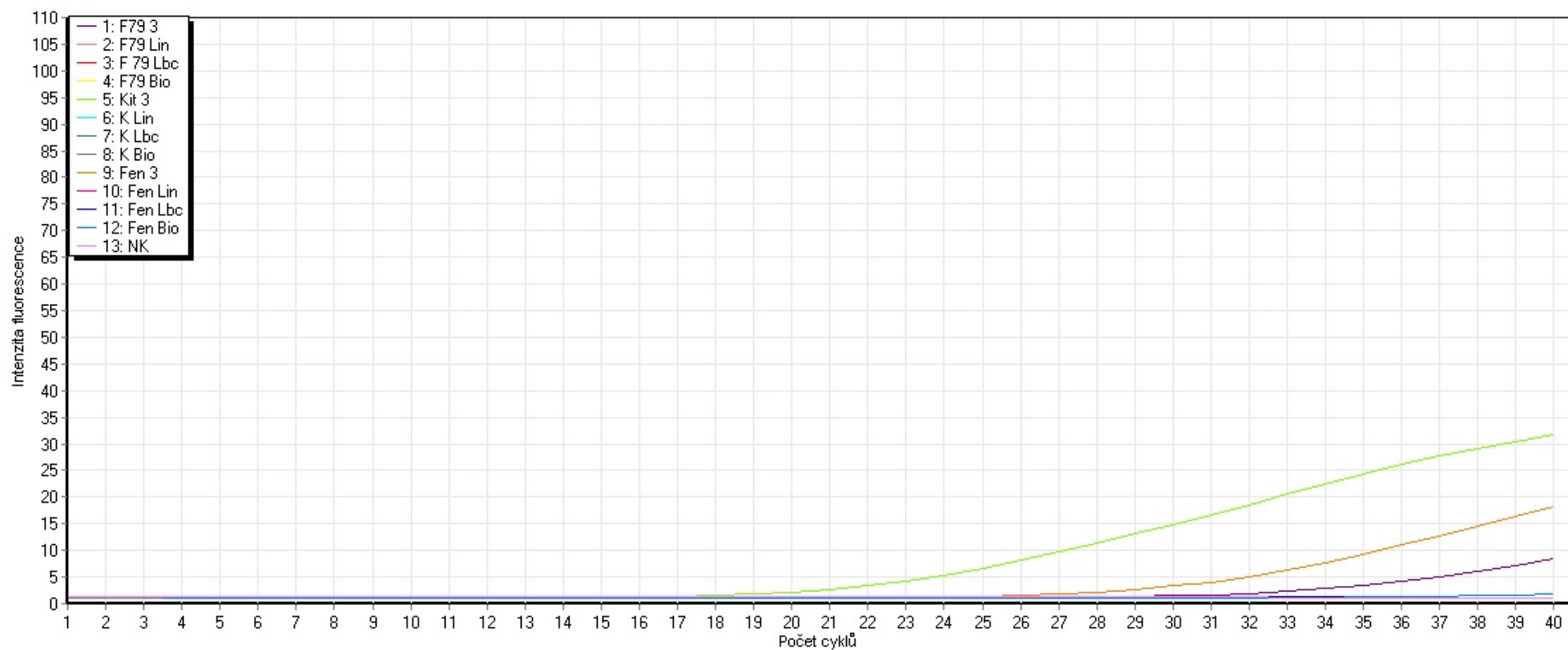


Obrázek 20: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus rhamnosus*.

Tabulka 32: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 20.

Běh	Izolovaná DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (400 bp a 200 bp)
5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	F79/L3-PLL	++
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Komerční kit	+++
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	Fenolová extrakce	++
8	Linex forte	F79/L3-PLL	–
9	Linex forte	Komerční kit	–
10	Linex forte	Fenolová extrakce	–
11	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	–
12	GS Laktobacily forte	Komerční kit	–
13	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	–
14	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
15	Biopron 9 premium	Komerční kit	–
16	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	+
17	DNA standart		100 bp
18	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



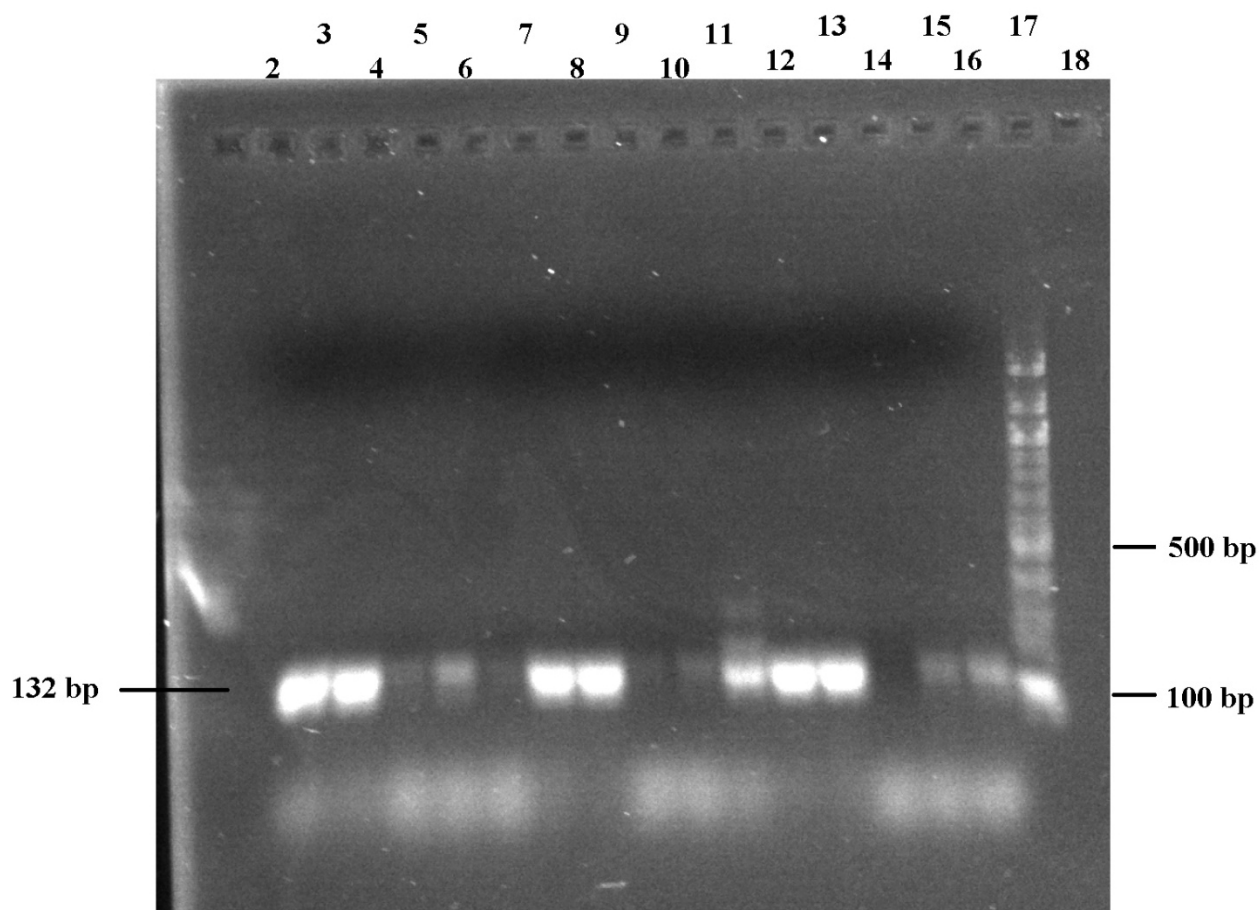
Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3, **K/Kit**– extrakce pomocí kitu, **Fen** – fenolová extrakce, **3** – *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 21: Amplifikační křivky druhu *Lactobacillus rhamnosus* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

5.2.8 PCR specifická pro druh *Lactobacillus casei*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus casei* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei* [41] podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.8. Jako pozitivní kontroly byly použity čisté kultury *Lactobacillus casei* ssp *casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus casei* CCM 4798. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 23.

Specifické amplifikační produkty byly také detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy, podle postupu, uvedeném v kapitole 4.3.7 jejíž výsledek je uveden na Obrázku 22 a v Tabulce 33. Byl amplifikován specifický produkt o délce 132 bp.

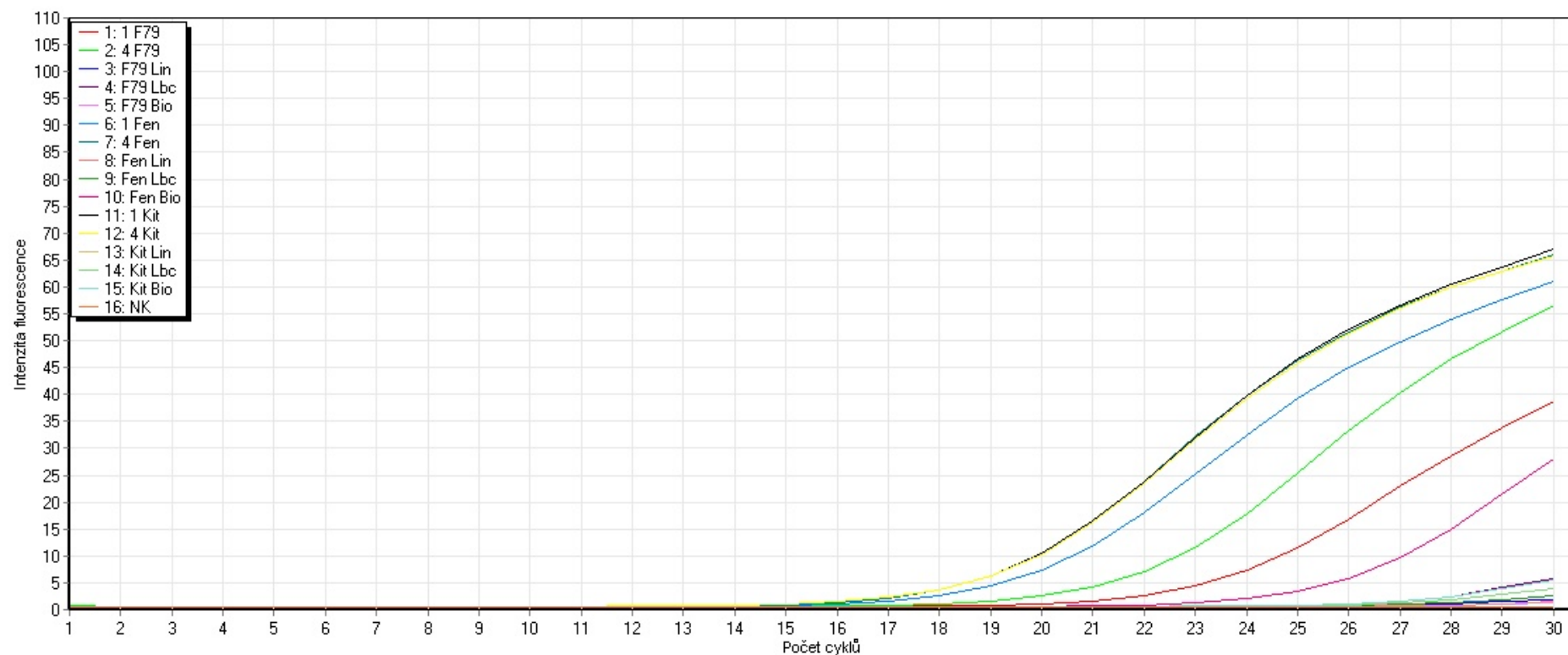


Obrázek 22: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus casei*.

Tabulka 33: Schéma nanesení elektroforézy na agarózovém gelu uvedeném na Obrázku 22.

Běh	Izolovaná DNA	Metoda izolace	Detekce produktu PCR (132 bp)
2	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	F79/L3-PLL	+++
3	<i>Lactobacillus casei</i> 4798	F79/L3-PLL	+++
4	Linex forte	F79/L3-PLL	–
5	GS Laktobacily forte	F79/L3-PLL	+
6	Biopron 9 premium	F79/L3-PLL	–
7	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Fenolová extrakce	+++
8	<i>Lactobacillus casei</i> 4798	Fenolová extrakce	+++
9	Linex forte	Fenolová extrakce	–
10	GS Laktobacily forte	Fenolová extrakce	+
11	Biopron 9 premium	Fenolová extrakce	++
12	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	Komerční kit	+++
13	<i>Lactobacillus casei</i> 4798	Komerční kit	+++
14	Linex forte	Komerční kit	–
15	GS Laktobacily forte	Komerční kit	+
16	Biopron 9 premium	Komerční kit	+
17	DNA standart		100 bp
18	NK		–

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, – nedetekován



Vysvětlivky: **F79** – extrakce pomocí magnetických částic F79/L3, **Kit**– extrakce pomocí kitu, **Fen** – fenolová extrakce, **1** – *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T, **4** – *Lactobacillus casei* 4798, **Lin** – probiotické tablety Linex forte, **Lbc** – probiotické tablety GS Laktobacily forte, **Bio** – Biopron 9 premium, **NK** – negativní kontrola

Obrázek 23: Amplifikační křivky druhu *Lactobacillus casei* – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce.

6 DISKUSE

6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Čistota a koncentrace izolovaná DNA, která byla připravena z narostlých kultur čistých kmenů a probiotických bakterií byla měřena na přístroji Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Potřebná koncentrace pro identifikaci bakteriální DNA metodou PCR je 10 ng/μl. V závislosti na metodě izolace byla izolovaná DNA v koncentracích od 2,4–3931,2 ng/μl. V Tabulce 34 jsou uvedeny koncentrace izolované DNA pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL), komerčního kitu a fenolové extrakce. Koncentrace izolované DNA pomocí magnetických částic se pohybovala v rozmezí 2,4–18,5 ng/μl. Koncentrace izolované DNA pomocí komerčního kitu se pohybovala v rozmezí 17,5–47,9 ng/μl. Poslední typ izolace byla izolace fenolovou extrakcí. Zde se pohybovala koncentrace izolované DNA v rozmezí 272,1–3931,2 ng/μl. Nejvyšší koncentrace izolované DNA se vyskytuje u metody fenolové extrakce. V porovnání s ostatními metodami se jedná o jeden až dva řády vyšší koncentrace izolované DNA. Vyšší koncentrace izolovaná DNA může být také způsobena větší účinností této metody, založené na rozdílnosti polaroty rozpouštědel, a to vody a fenolu a následném vysrážení ethanolem. Druhý nejvyšší rozsah koncentrací izolované DNA byl u komerčního kitu (QIAamp DNA Stool Mini Kit). Vyšší koncentraci izolované DNA deklaruje i výrobce a to 70–300 ng/μl. Koncentrace izolovaná DNA byla ovšem v našem případě nižší, avšak dostatečná pro detekci metodou PCR. Poslední metoda izolace DNA je izolace magnetickými částicemi F79/L3–PLL. Zde se pohybujeme v hodnotách nižších, než je potřebných 10 ng/μl pro metodu PCR. Nižší hodnota separace může být způsobena stářím magnetických částic, které mohou po 5 měsících agregovat a tím pádem může dojít ke snížení absorpční plochy těchto částic [33]. Pokud se zaměříme pouze na izolaci DNA z probiotických tablet, tak i zde je neúčinnější metodou fenolová extrakce. Největší množství izolované DNA napříč metodami bylo pozorováno u výrobku GS Laktobacily forte.

Pro použití izolované DNA bylo potřeba některé koncentrace zředit. Koncentrace vyšší než 20 ng/μl byly zředěny na 10 ng/μl.

Čistota bakterií byla měřena jako poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm. Jako čistá DNA je považována ta hodnota, kde se poměr absorbancí pohybuje v rozmezí 1,8–1,62. Pokud je poměr nižší než toto rozmezí, je zkoumaná DNA znečištěná proteiny, vyšší hodnota značí přítomnost RNA ve vzorku. Čistota izolované DNA se pohybovala v rozmezí 1,36–2,11. V Tabulce 35 jsou uvedeny čistoty izolované DNA pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL), komerčního kitu a fenolové extrakce. Čistota izolované DNA pomocí magnetických částic se pohybovala v rozmezí 1,36–1,85. Čistota izolované DNA pomocí komerčního kitu se pohybovala kolem hodnoty 1,99. Čistota izolované DNA metodou fenolové extrakce se pohybovala v rozmezí 1,99–2,11. Nejčistší DNA byla izolovaná pomocí komerčního kitu. Což odpovídá čistotě deklarované výrobcem. Čistota izolované DNA pomocí magnetických částic F79/L3–PLL byla většinou nižší, než je požadované rozmezí. DNA zde byla znečištěna proteiny, které tam zůstaly pravděpodobně v důsledku stáří magnetických částic, nebo nedostatečnému promytí izolované DNA. Hodnoty poměru absorbancí u metody fenolové izolace nám ukazují znečištěnou DNA RNA, což je způsobeno tím, že během této metody je RNA izolována společně s DNA [19]. Co se týče čistoty izolované DNA z probiotických výrobků, i zde nejčistší DNA byla u metody izolace pomocí komerčního kitu. Nižší hodnoty poměru absorbancí můžou být způsobeny nečistotami látek, které jsou použity jako pomocné látky v probiotických tabletách.

Pokud se zaměříme jak na čistotu, tak i na koncentraci izolované DNA, tak pro identifikaci DNA probiotických bakterií je nejvhodnější metoda izolace pomocí komerčního kitu. Izolujeme zde relativně čistou DNA v množství, které je dostatečné, dokonce vyšší než požadované množství 10 ng/μl.

Tabulka 34: Srovnání koncentrací izolované DNA v závislosti na metodě izolace.

Izolovaná DNA	Fenolová extrakce c [ng/μl]	Komerční kit c [ng/μl]	Magnetické částice c [ng/μl]
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	471,3	26,7	6,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	534,9	47,9	9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	773	23,2	18,5
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	686,5	28,5	8,4
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	788,9	31,1	5,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	290,8	45	10,3
Probiotické tablety Linex forte	404,3	17,5	2,5
Probiotické tablety GS Laktobacily forte	3931,2	42,3	10,1
Probiotické tablety Biopron 9 premium	272,1	22,5	2,4

Tabulka 35: Čistota izolované DNA v závislosti na metodě izolace.

Izolovaná DNA	Fenolová extrakce	Komerční kit	Magnetické částice
<i>Lactobacillus</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T	2,07	1,90	1,56
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 1825 ^T	2,08	1,94	1,85
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	2,06	1,92	1,56
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	2,04	1,96	1,74
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CCM 1753 ^T	2,11	1,96	1,60
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T	2,07	1,99	1,84
Probiotické tablety Linex forte	2,05	1,98	1,36
Probiotické tablety GS Laktobacily forte	2,09	1,97	1,61
Probiotické tablety Biopron 9 premium	1,99	1,9	1,47

6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

6.2.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Pro důkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* v probiotických tabletách a čistých kulturách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [41].

Na Obrázku 8 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrdily příslušnost izolované DNA do domény *Bacteria*. Touto metodou byla také kromě potvrzení přítomnosti bakteriální DNA pomocí komerční bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma–Aldrich) sestavena kalibrační křivka v rozsahu 10–0,001 ng/μl. *Escherichia coli* byla také použita jako pozitivní kontrola. Pomocí této křivky a softwaru pro cycler Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) byla stanovena přesná koncentrace izolované DNA ze vzorků. Zjištěná koncentrace je uvedena v Tabulce 24. Jak si můžeme všimnout, koncentrace DNA měřená na spektrofotometru a zjištěná pomocí cycleru Rotor-gene 6000 se liší. Rozdíl je v tom, že koncentrace měřená spektrofotometrem je koncentrace všech nukleových kyselin ve vzorku, tedy včetně RNA, cycler spočítá podle kalibrační křivky pouze koncentraci cílové DNA. Dále byla stanovena hodnota Ct, tato hodnota vyjadřuje prahový cyklus, při kterém dochází k statisticky významnému nárůstu fluorescence. Z toho vyplývá, že čím vyšší je původní množství DNA ve vzorku, tím nižší hodnota Ct (Tabulka 24). Přesnost výpočtu koncentrací, tedy i přesnost kalibrační křivky nám ukazuje koeficient lineární regrese R^2 , jenž má hodnotu 0,993; ta odpovídá hodnotě uvedenou výrobcem cycleru (0,999), která nám potvrzuje spolehlivost výsledků. I zde převládá trend, kdy nejvíce izolované DNA je pomocí fenolové extrakce a pomocí komerčního kitu.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 9). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do domény *Bacteria* specifickým produktem o délce 466 bp. Na agarózovém gelu lze pozorovat rozdílné intenzity výsledných produktů. Nejintenzivnější produkty můžeme pozorovat u DNA, které byly izolované pomocí komerčního kitu a metodou fenolové extrakce. Změřená koncentrace cílové DNA komerčního kitu se pohybuje v rozmezí 1,330–5,129 ng/μl, což odpovídá také intenzitě vzniklých produktů. Když se ale zaměříme například *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T (metoda fenolové extrakce), který má hodnotu cílové koncentrace 19,879 ng/μl, tak intenzita vzniklého produktu je slabá. Za to u *Lactobacillus casei* CCM 4798 (metoda fenolové extrakce) je naměřená koncentrace 1,655 ng/μl a intenzita vzniklého produktu je silná. Je to pravděpodobně způsobeno právě metodou izolace, a to fenolovou extrakcí, která dokáže izolovat

dostatečné množství DNA, ale také s vyšším množstvím inhibujících látek [19]. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.2 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Pro důkaz přítomnosti rodové DNA rodu *Lactobacillus* v probiotických tabletách a čistých kulturách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [42]. Jako pozitivní kontroly byly použity čisté kultury, uvedené v Tabulce 27. Na Obrázku 11 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrdily příslušnost izolované DNA do rodu *Lactobacillus*. Na základě amplifikačních křivek produktů můžeme pozorovat, že už kolem třináctého cyklu lze měřit fluorescenci u bakterií, které byly izolovány metodou fenolové extrakce, což odpovídá i účinnosti této metody. U dřívějších cyklů se i pohybuje detekce DNA izolované pomocí komerčního kitu. DNA separovaná pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL) je detekovaná v pozdějších cyklech, což je také spojeno s nižším množstvím izolované DNA. U probiotických výrobků můžeme pozorovat nástup fluorescence v dřívějších cyklech u Biopron 9 premium a GS Laktobacily forte 21 izolované metodou fenolové extrakce. Tyto výrobky mají dřívější nástup i u DNA izolované metodou komerčního kitu. U výrobku Linex forte je nástup fluorescence až v pozdějších cyklech, což je pravděpodobně způsobeno menším počtem přítomných kmenů. V Tabulce 1 můžeme vidět, že přítomnost rodu *Lactobacillus* deklarují všechny zkoumané výrobky, což nám potvrdila i PCR v reálném čase.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 10). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do rodu *Lactobacillus* specifickým produktem o délce 250 bp. [42]. Největší intenzitu vykazují izolované DNA opět pomocí komerčního kitu a pomocí metody fenolové extrakce. Srovnáním výsledků PCR v reálném čase a výsledků na agarózovém gelu vidíme, že intenzita jednotlivých produktů kopíruje výsledky PCR v reálném čase. Nejintenzivnější produkty jsou právě u metody fenolové extrakce a metody izolace pomocí komerčního kitu, zejména pak u výrobků Biopron 9 premium a GS Laktobacily forte 21 izolované metodou fenolové extrakce. Detekce produktu PCR nebyla zaznamenána u přípravků Linex forte a Biopron 9 premium, izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL). Jak můžeme vidět na Obrázku 10 tyto produkty měly pozdější nástup fluorescence během amplifikace a vzhledem k nižší citlivosti detekce pomocí agarózové gelové elektroforézy tedy nedošlo k detekci tohoto produktu. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.3 PCR specifická pro rod *Bifidobacterium*

Pro důkaz přítomnosti rodové DNA rodu *Bifidobacterium* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* [43]. Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987^T (10 ng/ µl) a *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T (10 ng/ µl). Na Obrázku 13 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují příslušnost izolované DNA do rodu *Bifidobacterium*. Jako největší fluorescence byla zaznamenána u amplifikačních produktů u pozitivní kontroly *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987^T (10 ng/ µl). Také byly zaznamenány produkty DNA izolované metodou fenolové extrakce a komerčního kitu, a to u výrobků Linex forte a Biopron 9 premium. Menší intenzita fluorescence produktů byla zaznamenána také u DNA výrobku Linex forte izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL). Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* nám deklarují všechny výrobky, ovšem podle našeho měření nebyl tento rod detekována u výrobku GS Laktobacily forte 21, a to ani jednou separační metodou. U ostatních výrobků se přítomnost potvrdila.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 12). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do rodu *Bifidobacterium* specifickým produktem o délce 914 bp [43]. Specifické produkty na agarózovém gelu kopírují výsledky PCR v reálném čase. Nejintenzivnější jsou produkty výrobků Linex forte a Biopron 9 premium izolované fenolovou extrakcí. Biopron 9 premium izolovaný pomocí komerčního kitu má intenzitu výsledného produktu slabou. Došlo zde k nízké detekci fluorescence už během amplifikace, proto je i intenzita na gelu nižší. Nižší detekci produktů také vidíme u DNA výrobku Linex forte izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL), který byl detekován v během amplifikace metodou PCR v reálném

čase. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.4 PCR specifická pro druh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* [41]. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T. Na Obrázku 15 můžeme vidět, amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují příslušnost izolované DNA do druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Největší intenzita je zaznamenána u amplifikačních produktů pozitivní kontroly, a to od všech metod izolace. U probiotických výrobků zde opět převažuje trend, kdy je zaznamenána největší a nejrychlejší nástup fluorescence DNA izolované metodou fenolové extrakce a komerčního kitu, a to u výrobků GS Laktobacily forte 21 a Bipron 9 premium. Objevuje se zde také významný nástup fluorescence u DNA izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL) a to u výrobku GS Laktobacily forte 21. Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nám deklaruje pouze jeden výrobek a to Bipron 9 premium, tento druh byl ale detekován v ostatních dvou přípravcích.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 14). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* specifickým produktem o délce 80 bp [41]. Specifické produkty na agarózovém gelu kopírují výsledky PCR v reálném čase. Nejintenzivnější jsou produkty pozitivní kontroly, a to u všech metod izolace. Opět svítí intenzivně produkty fenolové extrakce, a to u Bipron 9 premium. Silná intenzita produktů se objevuje také u GS Laktobacily forte 21 izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL). I zde byly potvrzeny produkty PCR potvrzující přítomnost druhové DNA *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* v přípravcích Linex forte a GS Laktobacily forte 21. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.5 PCR specifická pro *Lactobacillus plantarum*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus plantarum* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus plantarum* [44]. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T. Na Obrázku 17 můžeme vidět, amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují příslušnost izolované DNA do druhu *Lactobacillus plantarum*. Nejdříve vidíme amplifikační produkty pozitivní kontroly, a to u všech metod izolace. Co se týče izolované DNA z probiotických výrobků objevují se tu 2 křivky, a to izolovaná DNA metodou fenolové extrakce a metodou komerčního kitu. DNA izolovaná z probiotických výrobků pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL) se neamplifikovala. Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* nám deklaruji výrobky Bipron 9 premium a GS Laktobacily forte 21. Tento výsledek nám i potvrdila i PCR v reálném čase.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 16). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do druhu *Lactobacillus plantarum* specifickým produktem o délce 400 a 200 bp [44]. Specifické produkty na agarózovém gelu se zde liší od PCR. Produkty pozitivní kontroly jsou detekované u všech metod izolace. Odlišnost je zde v intenzitě produktu výrobku GS Laktobacily forte 21 izolované metodou komerčního kitu. Zatímco velikost intenzity fluorescence amplifikační křivky tohoto produktu je v grafu větší než u výrobku Biopron 9 premium, tak na gelu nesvítí skoro vůbec. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.6 PCR specifická pro *Lactobacillus acidophilus*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus* [45]. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T. Na Obrázku 19 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují přítomnost izolované DNA do druhu *Lactobacillus acidophilus*. Během této amplifikace došlo k detekci pozitivní kontroly pouze u dvou typů metod izolace DNA, a to u magnetických částic (F79/L3–PLL) a metody fenolové extrakce. Intenzita

fluorescence u pozitivní kontroly dosahuje v obou metodách izolace nižších hodnot, pravděpodobně zde nebyla izolovaná cílová DNA v takovém množství. U probiotických výrobků největších hodnot intenzity fluorescence zde dosahují DNA izolované metodou fenolové extrakce, a to u všech výrobků. Dále je zde velká intenzita fluorescence u výrobku GS Laktobacily forte 21, izolované pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL). Velké intenzity také dosahuje DNA izolovaná metodou komerčního kitu a to u všech výrobků. DNA pro druh *Lactobacillus acidophilus* byla během tohoto měření detekována u všech metod izolace u všech zkoumaných výrobků. Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* nám deklarují výrobky Bipron 9 premium a Linex forte. PCR v reálném čase nám potvrdila přítomnost tohoto druhu DNA ve výrobcích, ale tento druh se nám objevuje i v přípravku GS Laktobacily forte 21, a to u všech metod izolace. Výrobce přítomnost tohoto druhu neuvádí.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 18). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do druhu *Lactobacillus acidophilus* specifickým produktem o délce 800 bp [45]. Specifické produkty na agarózovém gelu kopírují výsledky PCR v reálném čase. Pozitivní kontrola je stejně jako u PCR v reálném čase nevýrazná, v případě izolace pomocí komerčního kitu nedetekovatelná. Opět jsou zde nejintenzivnějšími produkty izolované DNA metodou fenolové extrakce a komerčního kitu. Středně silná intenzita produktů je také zaznamenána u magnetických částic (F79/L3–PLL). Gel nám také potvrdil přítomnost druhové DNA pro *Lactobacillus acidophilus* u výrobku GS Laktobacily forte 21, které tento druh neuvádějí. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.7 PCR specifická pro *Lactobacillus rhamnosus*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [44]. Jako pozitivní kontrola byla použita čistá kultura *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Na Obrázku 21 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují přítomnost izolované DNA do druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Pozitivní kontrola byla detekována u všech metod izolace. Největší intenzita fluorescence byla zaznamenána u metody izolace DNA pomocí fenolové extrakce a metody komerčního kitu. Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* nám deklaruje výrobek Bipron 9 premium. PCR v reálném čase nám tento druh ale nepotvrdila, ani jednou metodou izolace DNA. U ostatních výrobků tento druh DNA výrobci nedeklarují.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 20). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do druhu *Lactobacillus rhamnosus* specifickým produktem o délce 400 a 200 bp [44]. Specifické produkty na agarózovém gelu kopírují výsledky PCR v reálném čase. Byly detekovány produkty PCR v reálném čase pro pozitivní kontrolu u všech metod izolace. Velmi slabá intenzita produktu je detekována i u Biopron 9 premium, jehož přítomnost nám deklaruje i výrobce. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.2.8 PCR specifická pro *Lactobacillus casei*

Pro důkaz přítomnosti druhové DNA druhu *Lactobacillus casei* v probiotických tabletách byla provedena PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei* [41]. Jako pozitivní kontroly byly použity čisté kultury *Lactobacillus casei* ssp *casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus casei* CCM 4798. Na Obrázku 23 můžeme vidět amplifikační křivky produktů, které nám potvrzují přítomnost izolované DNA do druhu *Lactobacillus casei*. Obě pozitivní kontroly byly detekovány u všech metod izolace. Největší intenzita fluorescence byla zaznamenána opět u metody izolace DNA pomocí fenolové extrakce a komerčního kitu. Silná intenzita fluorescence se také objevuje i u izolace pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL). U probiotických tablet zaznamenáváme největší intenzitu fluorescence u Bipron 9 premium (DNA izolovaná metodou fenolové extrakce), druhá největší intenzita je zaznamenána u GS Laktobacily forte 21 (metoda izolace pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL)). Podle Tabulky 1 můžeme vidět, že přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus casei* nám deklarují výrobky Bipron 9 premium a GS Laktobacily forte 21, což nám potvrdily i výsledky.

Výsledek PCR v reálném čase byl také potvrzen agarózovou gelovou elektroforézou (Obrázek 22). Na 1,5% gelu byla potvrzena příslušnost jednotlivých vzorků do druhu *Lactobacillus casei* specifickým

produktem o délce 132 bp [41]. Specifické produkty opět kopírují výsledky PCR v reálném čase. Nejintenzivnějšími produkty jsou zde pozitivní kontroly, a to stejně jako u amplifikačních křivek u všech metod izolace. Dalšími intenzivními produkty je zde DNA z výrobku Bipron 9 premium izolovaná metodou fenolové extrakce. DNA z výrobku GS Laktobacily forte izolovaná pomocí magnetických částic (F79/L3–PLL) má zde menší intenzitu, než bychom na základě amplifikačních křivek očekávali. Objevují se zde také produkty DNA z výrobku GS Laktobacily forte 21 izolované metodami fenolové extrakce a pomocí kitu a DNA z výrobku Bipron 9 premium izolovaná metodou komerčního kitu. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků během přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

7 ZÁVĚR

Probiotické bakterie se v dnešní době čím dál tím víc užívají v různých podobách (probiotické tablety, maso, mléko) jak pro zlepšení stavu střevní mikroflóry, tak ke zmírnění příznaků některých nemocí. Díky genům pro rezistenci vůči antibiotikům mohou probiotické bakterie udržet střevní homeostázu. Vzhledem k nadužívání antibiotik dochází k rozšiřování rezistence mezi patogenními bakteriemi a obavy z toho, že přenašečem mohou být právě probiotické bakterie. Z tohoto důvodu je potřeba rizikové bakterie detekovat, a omezit jejich přítomnost ve výše zmíněných potravinách. Pro detekci se v dnešní době využívá metoda RT–PCR, která je schopna efektivně a relativně rychle detekovat přítomnost daného kmene ve vzorku. K tomu je potřeba izolovat DNA v dostatečné koncentraci a čistotě. V posledních letech se k tomuto účelu mnohem častěji používá metoda izolace pomocí magnetických částic, které dokáží splnit požadavky PCR na kvalitu a množství izolované DNA.

V experimentální části byly zkoumány 3 výrobky s probiotickými tabletami. Po kultivaci bakterií mléčného kvašení vybraných čistých kultur byla z doplňků stravy a nakultivovaných bakterií izolovaná DNA. DNA byla izolovaná třemi různými metodami: metodou fenolové extrakce, izolací pomocí magnetických částic a pomocí komerčního kitu. Následně byl zkoumán vliv izolace DNA na koncentraci a čistotu získané DNA. Jako první metoda byla použita spektrofotometrie. Zde bylo zjištěno, že co se týče čistoty a množství izolovaných nukleových kyselin je nejlepší metoda izolace DNA pomocí komerčního kitu. Metoda komerčního kitu byla také vyhodnocena jako nejlepší metoda izolace i podle koncentrací cílové DNA zjištěné během RT–PCR pro doménu *Bacteria*.

Detekce DNA čistých kultur pomocí RT–PCR nám ukázala, že intenzita fluorescence amplifikované DNA je vysoká u všech metod izolace. Pokud tedy budeme zkoumat DNA čistých kultur, tak můžeme z hlediska intenzity fluorescence amplifikované DNA použít jakoukoliv z výše zmíněných metod. Intenzita fluorescence DNA izolovaná z probiotických výrobků byla největší u fenolové extrakce a komerčního kitu. Ze spektrofotometrického měření ale víme, že izolovaná DNA metodou fenolové extrakce je znečištěná RNA, z tohoto hlediska se jeví metoda fenolové extrakce jako méně vhodná metoda pro RT–PCR.

Pokud tedy chceme rychle a účinně izolovat DNA v dostatečné koncentraci a čistotě pro molekulárně biologické metody je nejlepší metoda komerčního kitu.

Během experimentu byl také zjišťován obsah probiotických tablet, a to u vybraných kmenů. Podle výsledků RT–PCR a agarózové gelové elektroforézy byl až na *Lactobacillus rhamnosus* potvrzen obsah výrobku Biopron 9 premium deklarovaný výrobcem. Nejhorší pak vyšel přípravek GS Laktobacily forte 21. Podle výsledků chybí ve výrobku bakterie rodu *Bifidobacterium* naproti tomu byly ve výrobku nalezeny stopy DNA po *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* a *Lactobacillus acidophilus*. Ve výrobku Linex forte byla zase detekovaná stopa DNA po *Lactobacillus paracasei*.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KECHAGIA, Maria, Dimitrios BASOULIS, Stavroula KONSTANTOPOULOU, Dimitra DIMITRIADI, Konstantina GYFTOPOULOU, Nikoletta SKARMOUTSOU a Eleni Maria FAKIRI. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* [online]. 2013, **2013**, 1-7 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.5402/2013/481651. ISSN 2314-4068. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/481651>
- [2] VIJAYA KUMAR, Bathal, Sistla VIJAYENDRA a Obulam REDDY. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. New Delhi: Springer India, 2015, **52**(10), 6112-6124 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.1007/s13197-015-1795-2. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4573104/>
- [3] YAVUZ, Cafer t., Arjun PRAKASH, J.t. MAYO a Vicki I. COLVIN. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science* [online]. Elsevier Ltd, 2009, **64**(10), 2510-2521 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.ces.2008.11.018. ISSN 0009-2509. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0009250908006477>
- [4] AGUILAR-ARTEAGA, K., J.a. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2010, **674**(2), 157-165 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0003267010008366>
- [5] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. Elsevier B.V, 2007, **311**(1), 249-254 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1157. ISSN 0304-8853. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0304885306025418>
- [6] GRANATO, Daniel, Gabriel f. BRANCO, Filomena NAZZARO, Adriano g. CRUZ a José a. f. FARIA. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. Malden, USA: Blackwell Publishing Inc, 2010, **9**(3), 292-302 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- [7] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik: Principles of benefit and safety evaluation of probiotics and characterization of registered food supplements containing probiotics and prebiotics. *Pediatrica pre prax*. Bratislava: SOLEN, 2009, **10**(6), 315-318. ISSN 1336-8168.
- [8] VEMURI, Ravichandra, Tanvi SHINDE, Madhur D SHASTRI et al. A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *International Journal of Medical Sciences* [online]. 2018, **15**(9), 840-848 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.7150/ijms.25004. ISSN 1449-1907. Dostupné z: <http://www.medsci.org/v15p0840.htm>
- [9] VITETTA, Luis, Gemma VITETTA a Sean HALL. Immunological Tolerance and Function: Associations Between Intestinal Bacteria, Probiotics, Prebiotics, and Phages. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02240. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02240/full>
- [10] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 1-16 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>

- [11] HORÁČKOVÁ, Šárka, Kristina BIALASOVÁ a Milada PLOCKOVÁ. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Mlékařské listy* [online]. 2018, **2018**(170), 22-24 [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_170-s.22-24.pdf
- [12] NOVÁČKOVÁ, Š. Nové trendy v probiotikách. *Mlékařské listy* [online]. b.r., **2010**(120), 19-22 [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/120_s._19-22.pdf
- [13] SANDERS, Mary ellen, Irene LENOIR-WIJNKOOP, Seppo SALMINEN et al. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2014, **13091**(1), 19-29 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.1111/nyas.12377. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12377>
- [14] GUO, Huiling, Lin PAN, Lina LI, Jie LU, Laiyu KWOK, Bilige MENGHE, Heping ZHANG a Wenyi ZHANG. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from Lactobacillus Isolated from Traditional Dairy Products. *Journal of Food Science* [online]. 2017, **82**(3), 724-730 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1111/1750-3841.13645. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1111/1750-3841.13645>
- [15] LAXMINARAYAN, Ramanan, Adriano DUSE, Chand WATTAL et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. Elsevier Ltd, 2013, **13**(12), 1057-1098 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9. ISSN 1473-3099. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1473309913703189>
- [16] DURANTI, Sabrina, Gabriele andrea LUGLI, Leonardo MANCABELLI et al. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology* [online]. 2017, **83**(3) [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1128/AEM.02894-16. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5244288/>
- [17] MATHUR, Shalini a Rameshwar SINGH. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2005, **105**(3), 281-295 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0168160505002618>
- [18] EGUEIMONDE, Miguel, Borja ESÁNCHEZ a Abelardo EMARGOLLES. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* [online]. Frontiers Media S.A, 2013, **4**(), 1-6 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00202. Dostupné z: <https://doaj.org/article/5403cb6da4f145d1a0f486e64e5a6a5e>
- [19] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1002/jssc.201300331>
- [20] WIKSTRÖM, Per, Susanne FLYGARE, Anne GRÖNDALEN a Per-Olof LARSSON. Magnetic aqueous two-phase separation: A new technique to increase rate of phase-separation, using dextran-ferrofluid or larger iron oxide particles. *Analytical Biochemistry* [online]. 1987, **167**(2), 331-339 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90173-4. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269787901734>
- [21] KARIMI, Z., L. KARIMI a H. SHOKROLLAHI. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science & Engineering C* [online]. Elsevier B.V, 2013, **33**(5), 2465-2475 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.045. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0928493113000581>
- [22] MATSUNAGA, Tadashi, Yoshiaki MAEDA, Tomoko YOSHINO, Haruko TAKEYAMA, Masaaki TAKAHASHI, Harumi GINYA, Junko AASAHINA a Hideji TAJIMA. Fully automated

- immunoassay for detection of prostate-specific antigen using nano-magnetic beads and micro-polystyrene bead composites, 'Beads on Beads'. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2007, **597**(2), 331-339 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.05.065. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007009531>
- [23] TOWLER, Philip h, J.david SMITH a David r DIXON. Magnetic recovery of radium, lead and polonium from seawater samples after preconcentration on a magnetic adsorbent of manganese dioxide coated magnetite. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 1996, **328**(1), 53-59 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/0003-2670(96)00080-3. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003267096000803>
- [24] ŠAFARÍKOVÁ, Mirka a Ivo ŠAFARÍK. Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 1999, **194**(1-3), 108-112 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00566-6. ISSN 03048853. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304885398005666>
- [25] TRACHTOVÁ, Štěpánka, Ondřej KAMAN, Alena ŠPANOVÁ, Pavel VEVERKA, Emil POLLERT a Bohuslav RITTICH. Silica-coated La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2011, **34**(21), 3077-3082 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1002/jssc.201100442. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201100442>
- [26] FUENTES, Manuel, Cesar MATEO, J.m. GUISÁN a Roberto FERNÁNDEZ-LAFUENTE. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Elsevier B.V, 2005, **20**(7), 1380-1387 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.bios.2004.06.004. ISSN 0956-5663. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0956566304002453>
- [27] HONG, Ruo-Yu, Jian-Hua LI, Shi-Zhong ZHANG, Hong-Zhong LI, Ying ZHENG, Jian-min DING a Dong-Guang WEI. Preparation and characterization of silica-coated Fe₃O₄ nanoparticles used as precursor of ferrofluids. *Applied Surface Science* [online]. 2009, **255**(6), 3485-3492 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.09.071. ISSN 01694332. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433208020801>
- [28] GUPTA, Ajay kumar a Mona GUPTA. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. Elsevier Ltd, 2005, **26**(18), 3995-4021 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0142961204009317>
- [29] MA, Zhiya a Huizhou LIU. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology* [online]. Elsevier B.V, 2007, **5**(1), 1-10 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.cpart.2006.11.001. ISSN 1672-2515. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1672251507000024>
- [30] SUN, Conroy, Jerry s.h. LEE a Miqin ZHANG. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. Elsevier B.V, 2008, **60**(11), 1252-1265 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.018. ISSN 0169-409X. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0169409X08001014>
- [31] ALI, Mohd. sajid, Goutam GHOSH a Goutam KABIR-UD-DIN. Amphiphilic drug persuaded collapse of polyvinylpyrrolidone and poly(ethylene glycol) chains: A dynamic light scattering study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier B.V, 2010, **75**(2), 590-594 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.002. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927776509004767>
- [32] YANG, Gao, Baolin ZHANG, Jun WANG, Songbo XIE a Xuan LI. Preparation of polylysine-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. Elsevier B.V, 2015, **374**(15), 205-208 [cit. 2019-04-16]. DOI:

- 10.1016/j.jmmm.2014.08.040. ISSN 0304-8853. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0304885314007380>
- [33] BABIČ, Michal, Daniel HORÁK, Miroslava TRCHOVÁ et al. Poly(l -lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2008, **19**(3), 740-750 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1021/bc700410z. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc700410z>
- [34] VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR (KVANTITATIVNÍ PCR, PCR V REÁLNÉM ČASE) V HEMATOLOGII A STUDIU MNOHOČETNÉHO MYELOMU. *Klinická onkologie* [online]. 2008, **21**(1), 220-222 [cit. 2019-04-24]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2008-09-30-supplement-1/prehled-vyuziti-metody-real-time-pcr-kvantitativni-pcr-v-realnem-case-v-hema/>
- [35] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [36] GIOVANNINI, Tiziana a Luigi CONCILIO. PCR Detection of Genetically Modified Organisms: A Review. *Starch - Stärke* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2002, **54**(8), 321-327 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1002/1521-379X(200208)54:8321::AID-STAR2223213.0.CO;2-J. ISSN 0038-9056. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-379X%28200208%2954%3A8%3C321%3A%3AAID-STAR2223213%3E3.0.CO%3B2-J>
- [37] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.j. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2015, **439**, 231-250 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. ISSN 0009-8981. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004483>
- [38] HEID, C A, J STEVENS, K J LIVAK a P M WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome Research* [online]. 1996, **6**(10), 986-994 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1101/gr.6.10.986. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.6.10.986>
- [39] VALASEK, Mark A. a Joyce J. REPA. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* [online]. 2005, **29**(3), 151-159 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1152/advan.00019.2005. ISSN 1043-4046. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/advan.00019.2005>
- [40] SIGMA-ALDRICH CO. *qPCR Technical Guide*. In: *Sigma-Aldrich®* [online]. 2008 [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>
- [41] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448991/>
- [42] DUBERNET, Ségolène, Nathalie DESMASURES a Micheline GUÉGUEN. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Elsevier B.V, 2002, **214**(2), 271-275 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/S0378-1097(02)00895-9. ISSN 0378-1097.
- [43] ROY, Denis a Stéphane SIROIS. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Blackwell Publishing Ltd, 2000, **191**(1), 17-24 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x. ISSN 0378-1097. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x>
- [44] WALTER, J, G TANNOCK, A TILSALA-TIMISJARVI, S RODTONG, D LOACH, K MUNRO, T ALATOSSAVA a G TANNOCK. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied*

and Environmental Microbiology [online]. 2000, **66**(1), 297-303 [cit. 2019-03-27]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91821/pdf/am000297.pdf>

- [45] GE, BEILEI, PING JIANG, FEIFEI HAN, NASREEN K. SALEH, NIVEDITA DHIMAN, DANIEL P. FEDORKO, NANCY A. NELSON a JIANGHONG MENG. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria from Retail Fermented Foods. *Journal of Food Protection* [online]. 2007, **70**(11), 2606-2612 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.4315/0362-028X-70.11.2606. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-70.11.2606>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

B – Bor

bp – pár bází

CFU – počet jednotek tvořící kolonie

Co – Kobalt

Cu – Měď

CCD – tekuté krystaly

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouvláknová DNA

dNTP – 2'-deonukleotid-5'-trifosfát

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

Fe – železo

Fe₂O₃ – oxid železitý (magnetit)

Fe₃O₄ – oxid železnato-železitý (maghemit)

GIT – gastrointestinální trakt

KCl – chlorid draselný

LED – elektroluminiscenční dioda

MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization

Mg²⁺ – hořečnatý kation

MgCl₂ – chlorid hořečnatý

NaOH – hydroxid sodný

Nd – neodim

(NH₄)₂SO₄ – síran amonný

Ni – nikl

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

SALDI – surface-assisted laser desorption/ionization

SDS – dodecyl sulfát sodný

Sm – samarium

TBE pufr – Tris–borát–EDTA pufr

TE pufr – Tris–EDTA pufr

Tris–HCl – tris hydrochlorid

qPCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

WHO – Světová zdravotnická organizace